

DIE MOLEKULARE GRÖSSE DER OPIOIDREZEPTOREN

Untersuchungen zur Frage der Multiplizität
und Modulation der Opioidrezeptoren mit Hilfe der
"Target Size Analysis"

Susanne Ott

DIE MOLEKULARE GRÖSSE DER OPIOIDREZEPTOREN
Untersuchungen zur Frage der Multiplizität und
Modulation der Opioidrezeptoren mit Hilfe der
"Target Size Analysis"

Dissertation der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilian-Universität
München

vorgelegt von
Susanne Ott
München 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.1986

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
<u>1. Einführung</u>	1
1.1 Opiate und Opioidrezeptoren	1
1.2 Multiplizität der Opioidrezeptoren	4
1.3 Struktur der Opioidrezeptoren	8
1.4 Problemstellung	13
<u>2. Methode</u>	14
2.1 Theorie der "Target Size Analysis"	14
2.1.1 Physikalische Grundlagen	14
2.1.1.1 Die Treffertheorie	14
2.1.1.2 Strahlenwirkung auf Materie	15
2.1.1.3 Grundgedanke der Target Size Analysis	18
2.1.2 Berechnung der molekularen Größe	19
2.1.3 Temperaturabhängigkeit	22
2.2 Methodik der Bestrahlung	23
2.2.1 Die Probe	23
2.2.2 Der Strahl	26
2.2.3 Dosisapplikation	27
2.3 Interpretation von Inaktivierungskurven	29
2.3.1 Verschiedene Inaktivierungskurven	29
2.3.2 Beurteilung von Inaktivierungskurven	31
2.3.2.1 Auswirkungen von indirekten Strahleneffekten	31
2.3.2.2 Anforderung an den Test zur Bestimmung des Aktivitätsverlusts in der bestrahlten Probe	32
2.3.2.3 Target Size Analysis bei interagierenden Molekülen	33
2.4 Experimenteller Teil	35
2.4.1 Tiere, Materialien und Geräte	35
2.4.2 Durchführung der Experimente	37

2.4.2.1 Vorbereitung der Proben zur Bestrahlung	37
2.4.2.2 Bestrahlung	40
2.4.2.3 Bestimmung der biologischen Aktivität in der Probe	44
2.4.3 Analyse der experimentellen Daten	48
3. Ergebnisse	50
3.1 Vorversuche	50
3.2 Strahleninaktivierung der Opioidbindung in lyophilisierten Membranen	52
3.3 Strahleninaktivierung in gefrorenen Membransuspensionen	56
3.4 Versuche zur Klärung des Unterschieds zwischen den Inaktivierungskurven	60
3.4.1 Bestrahlung lyophilisierter Membranen bei -70°C	60
3.4.2 Bestrahlung lyophilisierter Membranen unter Ausschluß von Luft	61
3.4.3 Bestrahlung rehydrierter, lyophilisierter Membranen	62
3.4.4 Zusatz von Antioxidantien	64
3.4.5 Verdünnungsversuche	65
3.5 Strahleninaktivierung bei intakten Gewebeschnitten	67
3.5.1 Rattengehirnschnitte	67
3.5.2 Intakte NG 108-15 Zellen	70
3.6 Bestimmung interner Standards	72
3.6.1 Flunitrazepambindung	72
3.6.2 Enzymkontrolle	72
3.7 Untersuchung der verschiedenen Opioidrezeptortypen	74
3.7.1 Liganden verschiedener Selektivität	74
3.7.2 Sequentielle Verdrängung des Liganden [³ H]Diprenorphin	77
3.7.3 Gewebe mit unterschiedlichen Rezeptorpopulationen	78

3.8 Opioidbindung in Gegenwart von Na^+ , Mg^{2+} und GTP	81
3.8.1 Opioidantagonisten	82
3.8.2 Reine Opioidagonisten	84
<u>4. Diskussion</u>	88
4.1 Abhängigkeit des Inaktivierungsverlaufs von der Vorbereitungsart des Untersuchungsmaterials	88
4.2 Größenbestimmung der die Opiode hochaffin bindenden Einheit	95
4.3 Verschiedene Opioidrezeptortypen	97
4.4 Größenunterschiede in der opioidbindenden Ein- heit, bei Bindung in An- bzw. Abwesenheit von Na^+ , Mg^{2+} und GTP	101
4.5 Inaktivierungskurven für die Opioidagonisten- bindung in Na^+ , Mg^{2+} und GTP	108
<u>5. Zusammenfassung</u>	112
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A_0 ; A	Meßbare Bindungsaktivität in der Probe vor (A_0) und nach Bestrahlung (A)
BREM	Bremazocin
C_1 ; C_2	prozentualer Anteil der jeweiligen Komponente bei mehr exponentiellen Kurven
cAMP	cyclisches (3',5') Adenosinmonophosphat
D_{37}	Strahlendosis, bei der noch 37% der Ausgangsaktivität erhalten bleibt
(k)Da	(kilo)Dalton
DADLE	(D-Ala ² , D-Leu ⁵) Enkephalin
DAGO	(D-Ala ² , MePhe ⁴ , Glyol ⁵) Enkephalin
DIPR	Diprenorphin
DTT	Dithiothreitol
EKC	Ethylketozyklazocin
GMP-PNP	Guanylyl-5' imidodiphosphat (stabiles GTP-Analogon)
GTP	Guanosintriphosphat
GTP!S	Guanosin-5'-(3-O-thio)-triphosphat (stabiles GTP Analogon)
(k)Gy	(kilo)Gray (1 Gy = 100 rad = 1 J/kg)
LET (= LEÜ)	Linearer Energietransfer (= lineare Energieübertragung)
LOF	Lofentanil
N-Proteine	nukleotidbindende Proteine
(N_s , N_i , N_o)	stimulatorisch (N_s) bzw. inhibitorisch (N_i) zu Adenylatzyklase, N_o mit noch unbekannter Funktion)

NAL	Naloxon
NG 108-15	Neuroblastoma x Glioma Hybridzelllinie
OXY	Oxymorphon
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
s	Steigungen der Inaktivierungskurven (proportional zur molekularen Größe des untersuchten Rezeptors)
S	Svedberg
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SUF	Sufentanil
SKF 10047	N-Allylnormetazocin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan



Morphin

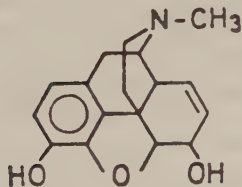


Naloxon

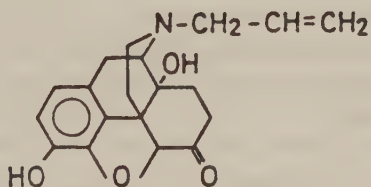
1. Einführung

1.1 Opiate und Opioidrezeptoren

Opium ist der eingetrocknete Milchsaft der unreifen Kapsel des Schlafmohns (*papaver somniferum*). Seine schlaffördernde, schmerzstillende und euphorisierende Wirkung wurde bereits vor 4000 Jahren von den Sumerern geschätzt (Madden, 1979). Der Name leitet sich vom griechischen Wort "opion" (=Saft) ab. Das Opium enthält mehrere Alkaloide mit Phenanthrengrundgerüst (Morphin, Codein, Thebain) sowie Benzylisochinoline (Papaverin, Noscarpin). Das Hauptalkaloid Morphin (ca. 10% des Gesamtalkaloidgehalts) wurde 1803 von Friedrich Sertürner isoliert. Es folgte die Elementaranalyse (Laurent, 1847) und erst 1925 gelang Gulland und Robinson die Strukturaufklärung, die etwa 25 Jahre später durch die Totalsynthese von Gates und Tschudi (1956) bestätigt wurde.



Morphin



Naloxon

In der Medizin wird Morphin hauptsächlich wegen seines analgetischen Effekts eingesetzt. Im Gegensatz zu den peripher wirkenden Schmerzmitteln greift Morphin im zentralen Nervengewebe an, wobei weniger die Empfindung selbst, als vielmehr die Bewertung des Schmerzes beeinflusst wird (Kuschinsky et al., 1978). Außerdem tritt eine Dämpfung des Atem- und Hustenzentrums auf, und eine hypnotische Wirkkomponente führt zu allgemeiner Verminderung der geistigen

Aktivität. Bei verstimmter Ausgangslage des Patienten tritt die euphorisierende Komponente deutlich hervor, die für die hohe Suchtpotenz der Substanz verantwortlich ist. Da außerdem sehr schnell eine Gewöhnung (Toleranz) auftritt, wird Morphin nur in Ausnahmefällen und nur kurzfristig als Analgetikum verwendet.

Auf der Suche nach Pharmaka, die zwar die positive schmerzstillende Wirkung, nicht aber die atemdepressive und suchterregende Nebenwirkung des Morphins aufweisen, wurde das Morphinmolekül chemisch abgewandelt. Auf diese Weise wurden besonders stark wirksame, aber auch stark suchterregende Substanzen wie das Heroin (Wright, 1874) erhalten, bei dem die Hydroxylgruppen verestert sind. Andererseits hat die Methylierung der phenolischen OH-Gruppe einen sehr starken Affinitätsverlust zur Folge (siehe Codein). Das Einführen einer Allylgruppe am Stickstoff des Morphins führt zu Substanzen mit morphinantagonistischer Wirkung (Pohl, 1915), wie z.B. Naloxon. Viele dem Morphin zum Teil nur entfernt ähnelnde Substanzen (z.B. Fentanyl, Methadon, Tifluadom) wurden synthetisiert, die die schmerzstillende Wirkung des Morphins nachahmen und zum Teil übertreffen, aber alle auch Nebenwirkungen auf das psychische Erleben des Patienten aufweisen.

Da "Struktur-Wirkungs-Beziehungen" aufgezeigt werden konnten (Braenden et al., 1955), die für die meisten morphinartigen Substanzen gelten und vor allem da spezifische Antagonisten bekannt sind, lag der Gedanke nahe, daß Opiate ihre Wirkung über eine spezifische Rezeptorinteraktion ausüben. Sehr stark für diese Möglichkeit sprach auch, daß die Wirkungen schon in niedrigen Konzentrationen auszulösen sind, und daß von den stereoisomeren Molekülen meist nur die (-)Isomere eine Wirkung aufweisen (Beckett und Casy, 1954; Portoghese, 1965).

Das Konzept, daß Stoffe ihre Wirkung über eine Interaktion auf molekularer Ebene mit nur ganz bestimmten Zell-

strukturen (receptive substances) des Organismus ausüben, wurde bereits 1878 von Langley aufgestellt. Auch Paul Ehrlich (1913) formulierte diese Idee im Zusammenhang mit seiner Arbeit über die Wirkung von Chemotherapeutika und ging soweit zu postulieren: "corpora non agunt nisi fixata". Direkte Untersuchungen und Demonstration von Rezeptoren wurde erst mit der Entwicklung von Radiorezeptorstudien (Roth, 1973; Ariens, 1979), wobei radioaktiv markierte Liganden an den Rezeptor gebunden werden, möglich. Mit dieser Methode gelang es nach Vorarbeiten von Goldstein und Mitarbeitern (Goldstein et al., 1971), drei Arbeitsgruppen (Terenius, 1973; Pert und Snyder, 1973a; Simon et al., 1973) etwa gleichzeitig, spezifische Bindungsstellen für Opiate im zentralen Nervensystem nachzuweisen. In nachfolgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, daß es sich um eine sättigbare, reversible und stereoselektive Bindung handelt (Pert und Snyder, 1973b). Sie ist empfindlich gegenüber pH- und Temperaturveränderungen, sowie gegenüber proteinmodifizierenden Reagentien (Snyder, 1975; Simantov et al., 1976; Simon und Hiller, 1978), was darauf hindeutet, daß die Bindung an spezifische Biomakromoleküle erfolgt. Da außerdem die spezifischen Bindungsstellen in Gewebepräparationen gefunden wurden, die mit dem Ort pharmakologischer Wirkungen übereinstimmen (Kuhar et al., 1973), und eine recht gute Korrelation von Bindungsstärke und pharmakologischer Wirkstärke der Opiate gezeigt wurde (Creese und Snyder, 1975; Pert und Snyder, 1973a), kann die demonstrierte Bindung als Nachweis für die Existenz von Opioidrezeptoren gelten.

Die Entdeckung der Opioidrezeptoren warf die Frage nach deren physiologischer Bedeutung auf. Es war nicht anzunehmen, daß der Organismus diese Rezeptoren nur für exogene Stoffe bereithielte, und daher setzte die Suche nach den endogenen Liganden ein. 1975 fanden Hughes und Mitarbeiter opioidartig wirkendes Material in Extrakten von Gehirngewebe. Die Analyse ergab zwei Pentapeptide, die sich nur in der C-terminalen Aminosäure unterschieden (Tyr-Gly-Gly-Phe Leu Met). Sie wurden von ihren Entdeckern Leucin- bzw. Methio-

nin-Enkephalin genannt. In der Folgezeit wurden weitere Peptide höheren Molekulargewichts entdeckt, z.B. β -Endorphin (Bradbury et al., 1976; Cox et al., 1976) oder Dynorphin A (Goldstein et al., 1981; Chavkin et al., 1982). Es konnten drei verschiedene hochmolekulare Vorläufer entdeckt werden, aus denen die Vielfalt der Opioidpeptide¹ durch Spaltung entsteht (Höllt, 1983): das Proopiomelanocortin (Nakanishi et al., 1979), das Proenkephalin A (Noda et al., 1982) und das Proenkephalin B (Kadikani et al., 1982).

Die physiologische Funktion der verschiedenen Opioidpeptide ist noch nicht völlig geklärt. Eine Beteiligung an der Reaktion des Organismus auf Schmerz und Streß liegt nahe, zusätzlich scheinen sie auch Neurohormon-, Neurotransmitter- und Neuromodulatorfunktionen aufzuweisen (Herz, 1984 a und b; Millan und Herz, 1985; Snyder, 1977).

1.2 Die Multiplizität der Opioidrezeptoren

Schon früh in der Opiatforschung wurde die Einheitlichkeit der Opioidrezeptoren in Frage gestellt (Dole et al., 1974), da bei genauerer Betrachtung gewisse Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Opiate festgestellt wurden. Martin und Mitarbeiter beobachteten in Versuchen am spinalisierten Hund deutlich andersartige Wirkungen von Morphin einerseits und den Benzomorphan-ähnlichen Opiaten andererseits (Martin et al., 1976; Gilbert und Martin, 1976). Außerdem zeigten sie, daß Entzugerscheinungen am morphintoleranten Hund

¹ Die endogenen morphinartig wirkenden Substanzen weisen alle Peptidcharakter auf und werden als "Endorphine" (endogene Morphine) bezeichnet, im Gegensatz zu den Opiaten, die zu der Gruppe der Alkaloide gehören. Es wurde daher vorgeschlagen, den Ausdruck "Opioid" als Überbegriff für alle endogenen, natürlichen und synthetischen Substanzen mit morphinähnlicher Wirkung zu verwenden, und ihren Rezeptor analog als "Opioidrezeptor" zu bezeichnen (Int. Narc. Res. Conf., Garmisch-Partenkirchen, 1983).

nicht vollständig durch Gabe von Opiaten des Benzomorphan-typs aufgehoben werden. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren auf die Existenz von unterschiedlichen Rezeptoren, und schlugen folgende Einteilung vor: einen μ -Rezeptortyp, an den Morphin bevorzugt bindet; einen κ -Rezeptortyp für den die Benzomorphanderivate wie Ketocyclazocine hohe Affinität aufweisen; und einen σ -Typ, für den das SKF 10047 (= N-Allylnormetazocin) als prototypischer Ligand gilt. Weitere Untersuchungen konnten diese These der "multiplen Opioidrezeptoren" unterstützen und erweitern. Beim Vergleich der analgetischen Wirkung der einzelnen Opiate wurde nicht immer die gleiche Reihenfolge in der Wirkstärke in verschiedenartigen Schmerztests erhalten (Schmauss und Yaksh, 1984). Auch zeigte sich bei Versuchen an isolierten Organen, daß z.B. Morphin am Longitudinalmuskel des Meerschweinchenileums (GPI) die elektrisch induzierte Kontraktion sehr viel stärker hemmt als Enkephalin, während dieses Opioid am Samenstrang der Maus (MVD) höhere Wirksamkeit als Morphin aufweist (Lord et al., 1977). Daraus wurde auf die Existenz von unterschiedlichen Opioidrezeptortypen in diesen Präparationen geschlossen. Der das Enkephalin bevorzugende Rezeptortyp des MVD wurde als δ Rezeptor bezeichnet. Am Samenstrang der Ratte, der sowohl gegenüber Morphin wie auch gegenüber den Enkephalinen relativ unempfindlich ist, wurde ein ϵ -Rezeptor, ein bevorzugt das β -Endorphin bindender Rezeptortyp, charakterisiert (Schulz et al., 1979 und 1981a; Wüster et al., 1980 und 1981).

Ein wichtiger Hinweis auf die Existenz der verschiedenen Opioidrezeptortypen bietet das Phänomen der selektiven Toleranzentwicklung. Wird ein Präparat, das verschiedene Rezeptortypen aufweist, durch einen selektiven Liganden an einem bestimmten Typ tolerant gemacht, so weist das Präparat dennoch volle Sensitivität gegenüber Liganden, die mit anderen Rezeptortypen interagieren, auf (Schulz et al., 1981b; Wüster et al., 1981). Analog konnte auch gezeigt werden, daß mit selektiven, irreversiblen Liganden ein bestimmter Rezeptortyp inaktiviert werden kann, ohne die anderen Typen zu

beeinflussen (Chavkin und Goldstein, 1981; James et al., 1982; Portoghese et al., 1979; Rothman et al., 1984; Rice et al., 1983).

Mittels Radiorezeptorstudien wurde auch die Existenz multipler Rezeptorpopulationen im Gehirn von Meerschweinchen (Kosterlitz et al., 1981; Leslie und Kosterlitz, 1979; Lord et al., 1977) und der Ratte (Chang und Cuatrecasas, 1979; Gillan und Kosterlitz, 1982; Pfeiffer und Herz, 1982) nachgewiesen.

Mit Hilfe von Bindungsstudien (Chang et al., 1979) und Autoradiographie (Goodman et al., 1980) konnte innerhalb des zentralen Nervensystems eine unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Rezeptortypen demonstriert werden. So findet sich im Thalamus und Hypothalamus eine besonders hohe Dichte an μ -Rezeptoren, während im Striatum der δ -Rezeptor vorherrscht (Chang et al., 1979). κ -Rezeptoren wurden im limbischen System, im Hypothalamus, und auch im Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesen (Pfeiffer et al., 1982; Członkowski et al., 1983). Auch zwischen den einzelnen Spezies tauchen Unterschiede der Typenverteilung auf. Während bei der Ratte der Anteil des κ -Typs im Gehirn höchstens 20% der Gesamt-opioidbindung ausmacht, findet sich im Gehirn des Meerschweinchens ca. 50%, und im Froschgehirn ca. 70-80% der Bindung am κ -Typ (Maurer, 1982; Werling et al., 1985). Eine Präparation, die ausschließlich den δ -Typ enthält, stellt die Tumorzelllinie NG 108-15 (Chang et al., 1978) dar, die durch Hybridisierung von Mäuseneuroblastoma- mit Rattengliomazellen erhalten wurden (Klee und Nirenberg, 1974; Hamprecht, 1976).

Weiterhin wurde auf der Grundlage von verschiedenen Affinitäten bestimmter Liganden im Radiorezeptorassay eine Unterteilung der Rezeptortypen in Subtypen vorgeschlagen (μ_1 : Pasternak, 1986; δ_1 und δ_2 : Barnard und Demoliou-Mason, 1983; κ_1 : Attali et al., 1982; Pfeiffer et al., 1981a; Su, 1985).

Die molekulare Grundlage der Rezeptorheterogenität ist noch nicht geklärt. Die Frage ist, ob es sich dabei um voneinander unabhängige, verschiedene Moleküle handelt. Andererseits wurde postuliert, daß μ - und δ -Typen nur Zustandsformen eines Rezeptors darstellen, die durch allosterische Modulatoren wie Na^+ -Ionen und GTP ineinander übergeführt werden (Bowen et al., 1981). Ein anderes Modell schlägt vor, daß die Bindungsstellen für Morphin und Enkephalin auf einem Rezeptormolekül, allerdings in verschiedenen Regionen, zu finden seien (Lee und Smith, 1980). Dafür sprechen auch Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung von μ - und δ -Bindungsstellen (Rothman et al., 1984; Rothman und Westfall, 1982).

Die Existenz verschiedener Rezeptortypen für Hormone und Neurotransmitter ist eher die Regel als eine Ausnahme (z.B. muscarinische Rezeptoren M_1 und M_2 , Adenosinrezeptoren A_1 und A_2 , Vasopressinrezeptoren V_1 und V_2). Einige konnten nicht nur durch ein unterschiedliches Bindungsverhalten mehrerer Liganden charakterisiert werden, sondern sie sind auch an verschiedene Effektorsysteme (Adenylatzyklase, Inositolphosphatumsatz etc.) gekoppelt. Bei den Opioidrezeptoren konnten bisher noch keine unterschiedlichen Effektoren nachgewiesen werden. Nur für den δ -Rezeptor ist über die Effektorkoppelung einiges bekannt. So konnte gezeigt werden, daß in NG 108-15 Zellen, die nur den δ -Rezeptortyp enthalten, Opioide die durch Prostaglandin stimulierte Produktion von cAMP hemmen (Traber et al., 1975), indem sie das Enzym Adenylatzyklase inhibieren (Sharma et al., 1975). Auch im Rattenstriatum, das besonders reich an Rezeptoren des δ -Typs ist, wurde eine Hemmung der Adenylatzyklase nachgewiesen (Law et al., 1981). Versuche von Lux und Schulz (1986) hingegen sprechen dafür, daß der präsynaptisch lokalisierte δ -Rezeptor am Samenstrang der Maus ein anderes Effektorsystem ansprechen muß, da durch Pertussistoxin keine Verminderung des Effekts zu beobachten war. Dieses Toxin führt üblicherweise zu einer spezifischen Veränderung der N_i -Einheit, die Teil des Adenylatzyklasesystems ist, und mit dem Rezeptor assoziiert ist.

Auch die allosterische Modulation der Agonistenbindung durch GTP verläuft über diese nucleotidbindenden regulatorischen N-Proteine (Limbird, 1981). Im Rattengehirn werden sowohl μ -, δ - als auch κ -Liganden durch GTP und Na^+ allosterisch beeinflusst (Blume, 1978). Gewisse Unterschiede in der Sensitivität der Liganden gegenüber der GTP- und Na^+ -Modulation (Pfeiffer et al., 1981b) müssen nicht notwendig mit einer Koppelung der Rezeptortypen an verschiedene regulatorische N-Proteine zusammenhängen, sondern können auch auf unterschiedlichen Agonist-Antagonist-Eigenschaften der betrachteten Liganden beruhen.

1.3 Struktur des Opioidrezeptors

Über die Struktur der Opioidrezeptoren ist noch nicht viel bekannt. Bei Zellfraktionierung findet man sie hauptsächlich gebunden in der Zellmembran (Pert et al., 1973b; Terenius, 1973; Glasel und Venn, 1984). Für solche intrinsisch gebundene Moleküle sind die üblichen Methoden zur Größenbestimmung und Strukturaufklärung nur schwierig anzuwenden. Einige Hinweise über die Natur des Rezeptors konnten aber mit Hilfe von Versuchen mit spezifisch inaktivierenden Reagentien gewonnen werden. Da Behandlung der Membranen mit Trypsin (Pasternak und Snyder, 1974) oder Chymotrypsin (Pasternak und Snyder, 1975) zum Verlust der Opioidbindung führt, handelt es sich beim Rezeptormolekül höchstwahrscheinlich um ein Protein oder zumindest ein Molekül, das einen essentiellen Proteinanteil aufweist. Auch SH-gruppenalkylierende Substanzen wie N-Ethylmaleimid vermindern die Opioidbindung (Simon und Groth, 1975), was einen Hinweis auf die Existenz von essentiellen SH-Gruppen darstellt. Auf Grund solcher Versuche ist allerdings nicht zu entscheiden, ob das proteolytische Enzym oder die SH-alkylierende Substanz direkt am Rezeptormolekül angreifen, oder ob dadurch andere Membranbestandteile modifiziert werden und sich dies indirekt auf die Opioidbindung auswirkt.

Auch lipidverändernde Substanzen wie Phospholipase A (Pasternak und Snyder, 1975) und Arylsulfatase (Law et al., 1979) können die Opioidbindung vermindern. Eine Zugabe von Phospholipiden hingegen führt zu einer Erhöhung der Opioidbindung (Abood und Takeda, 1976), und es konnte sogar eine stereoselektive Bindung von Opioiden an Cerebroside (Loh et al., 1974) und andere Membranlipide (Abood und Hoss, 1975) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch Lipide für die Opioidbindung eine Rolle spielen (Lee und Smith, 1980). Dies würde auch die besondere Empfindlichkeit des Opioidrezeptors gegenüber Detergentien erklären (Barnard und Demoliou-Mason, 1983). Fraglich ist jedoch eine direkte Beteiligung von Lipiden an der Opioidbindung, denn es ist möglich, daß die Lipidbestandteile der Membran nur für das Aufrechterhalten einer bestimmten aktiven Konformation des Rezeptors wichtig sind.

Solubilisierete Opioidrezeptoren können von einer Lectinsäule zurückgehalten werden (Gioannini et al., 1982). Dies ist ein Hinweis darauf, daß der solubilisierete Rezeptor einen Zuckeranteil aufweist. Da die Lectinbindung nicht mit der Bindung der Opioidliganden interferiert, ist anzunehmen, daß der Kohlenhydratrest an einer anderen Seite als der der Bindungsstelle selbst lokalisiert ist. Andererseits kann aber auch eine Kosolubilisierung des Rezeptors mit einem benachbarten Kohlenhydrat nicht ausgeschlossen werden.

Diese indirekten Methoden können zwar die Bedeutung von sowohl Lipiden, Proteinen wie auch Kohlenhydratanteilen für die Opioidbindung zeigen, eine direkte Aussage über den Aufbau des Opioidrezeptors ist aber nicht möglich. Dazu wäre eine Isolierung und Reinigung des Rezeptormoleküls nötig, das, wie schon erwähnt, ein intrinsisches Molekül der Doppel lipidmembran ist, d.h. das Molekül ist fest in der Lipidschicht verankert. Daher ist es wahrscheinlich, daß es nach außen gerichtete lipophile Bereiche aufweist. Ein Herauslösen solcher Moleküle aus der Membran gelingt nur durch Behandlung mit Detergentien, wobei ionische Detergentien die

Bindungsfähigkeit der meisten Rezeptoren zerstören (Helenius und Simons, 1975). Etwas schonender lösen nichtionische Tenside, wie z.B. Chaps oder Triton X 100 die Rezeptoren aus der Membran; aber auch hier hat die Anwesenheit des Detergens großen Einfluß sowohl auf die Bindungsfähigkeit des Rezeptors, als auch auf die physiko-chemischen Eigenschaften des solubilisierten Makromoleküls. Das Detergens muß daher nach dem Solubilisieren weitgehend entfernt werden, was seinerseits aber wieder zu Schwierigkeiten führen kann. So aggregieren viele solubilisierter Moleküle bei niedriger Detergentienkonzentration, wahrscheinlich auf Grund der oben erwähnten hydrophoben Molekülanteile. Theoretisch kann es auch zu einer vollkommenen Umlagerung der Rezeptorstruktur kommen, wenn die normalerweise nach außen in eine lipophile Umgebung weisenden Rezeptoranteile im wässrigen Milieu sich eher nach innen ausrichten, was sich natürlich auf die Ligand-Rezeptor Interaktion auswirken würde. Der Rezeptor muß also in wässrigem Milieu durch ein Tensid "stabilisiert" werden. Dies allerdings macht eine Bestimmung der molekularen Größe durch hydrodynamische Messungen schwierig, da die Menge an gebundenem Tensid mitgemessen wird. Ein weiteres Problem ist, daß das Solubilisieren mittels schonender Verfahren, die nötig sind, um die Opioidbindungsfähigkeit zu erhalten, nicht notwendig auch zur Isolierung des reinen Rezeptormoleküls ausreicht. Es ist vielmehr möglich, daß kleinere Membranteile als Ganzes solubilisiert werden. Daher sind Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung, die mit solubilisierten Rezeptoren erzielt wurden, von der Art und Menge des verwendeten Detergens abhängig (Glasel und Venn, 1984). So läßt sich wohl auch die große Diskrepanz zwischen den Werten erklären, die in der Literatur als Molekulargewichte für solubilisierter Opioidrezeptoren angegeben wurden. Diese reichen von 28 bis 500 kDalton (kDa) (Bidlack et al., 1981; Chow und Zukin, 1983; Dornay und Simantov, 1982; Howells et al., 1982; Itzak et al., 1984; Simon et al., 1984; Maneckjee, 1985; Simonds et al., 1980; Zukin und Kream, 1979).

Die Probleme der eben beschriebenen Meßmethode beruhen hauptsächlich auf der Tatsache, daß der Rezeptor nach dem Solubilisieren durch Bindung als solcher erkannt werden muß. Dies wird durch die Methode der sog. "Photoaffinitätsmarkierung" umgangen. Hierbei wird der Rezeptor schon vor der Behandlung mit einem Detergens radioaktiv markiert. Dafür muß ein radioaktiv markierter Ligand kovalent, z.B. durch Photoaktivierung, an den Rezeptor gebunden werden, da eine reversible Bindung der üblichen Liganden durch Detergentien sofort wieder aufgehoben wird. Ist der Rezeptor aber einmal kovalent markiert, muß keinerlei Rücksicht auf seine Bindungsfähigkeit genommen werden. Es können dann drastische Bedingungen zum sicheren Herauslösen des Rezeptors aus dem Molekülverband der Membran angewendet werden. Ohne Rücksicht auf die native Konfiguration kann unter denaturierenden Bedingungen die Größe des radioaktiv markierten Moleküls mittels SDS-Gelelektrophorese bestimmt werden. Klee und Mitarbeiter (1982) stellten fest, daß in NG 108-15 Zellen ein irreversibles radioaktives Opiat an eine Polypeptidkette der Größe 58 kDa bindet. Dieses Ergebnis konnte auch im Rattengehirn bestätigt werden (Newman und Barnard, 1984). Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß über die Funktionsfähigkeit dieser 58 kDa Einheit keinerlei Aussage gemacht werden kann. Ob diese Größe in der Lage ist, aktiv den Liganden zu binden, oder ob dazu noch zusätzliche Untereinheiten benötigt werden, bleibt offen.

Über diesen funktionalen Aspekt gibt eine weitere Methode, die "Target Size Analysis", Auskunft (Übersichtsarbeiten: Hutchinson und Pollard, 1961; Kempner und Schlegel, 1979; Jung, 1984). Mittels dieser Methode kann die minimale Einheit bestimmt werden, die benötigt wird, damit eine bestimmte Funktion, hier die Bindung des Opioids an seinen Rezeptor, beobachtet wird. Nachdem in den 20er Jahren das Trefferprinzip als Grundlage von Strahlenwirkungen ausgearbeitet war, wurde in den folgenden Jahren dieses Prinzip zur Bestimmung eines sogenannten "strahlenempfindlichen Volumens" von biologischen Strukturen angewendet. In Frankreich

entwickelte vor allem Holweck (Holweck, 1938) diese Methode, die er "statistische Ultramikrometrie" nannte. Dieser Ausdruck weist darauf hin, daß man dabei nicht die Ausdehnung von einzelnen Partikeln direkt bestimmt, sondern daß von dem statistischen Verhalten biologischer Strukturen gegenüber Strahlung auf deren molekulare Ausdehnung geschlossen wird. Unabhängig von Holweck wurde die gleiche Methode in Deutschland von Timoféeff-Ressovsky und Zimmer (1947) sowie in England von Lea (1946) angewendet und ausgearbeitet. Da sich die nachfolgende Literatur hauptsächlich auf Lea bezog, wurde meist der im Englischen übliche Name der "Target Size Analysis" (dt.: Treffbereichsbestimmung) übernommen. In den 50er Jahren wurde diese Methode zur Größenbestimmung vieler Enzyme verwendet. Später verlor sie an Bedeutung, und andere Bestimmungsmethoden für lösliche Moleküle überwogen. Allerdings blieb sie die einzige Methode, mit der unlösliche Moleküle auch in ungereinigten Präparationen untersucht werden können. Daher eignet sie sich vor allem zur Größenbestimmung von membrangebundenen Enzymen und Rezeptoren, da das Solubilisieren und Isolieren umgangen werden kann. Neben diesem Vorteil ist auch von Bedeutung, daß mit der "Target Size Analysis" funktionale und nicht strukturelle Größen gemessen werden (siehe Methodenteil), und somit die Ergebnisse auch in Kombination mit Daten aus der Größenbestimmung nach Solubilisierung von großem Interesse sind.

Nach den vielen widersprüchlichen Daten, die für solubilisierbare Opioidrezeptoren erhalten wurden, lag es nahe, die Molekülgröße der funktionalen Einheit des Rezeptors mit der "Target Size Analysis" zu untersuchen. Nach Beginn der vorliegenden Arbeit veröffentlichten McLowhan et al. (1983) eine Studie über die "Target Size Analysis" des Opioidrezeptors in neuronalen Tumorzellen. Sie berechneten eine Molekülgröße von 200 kDa, einen Wert, der mit unseren Versuchen sowohl in NG 108-15 Zellen, wie auch in Rattengehirnen nicht übereinstimmte. Nach einer ersten Veröffentlichung unseres Ergebnisses von nur ca. 100 kDa (Ott et al., 1983), wurde dieses von einer weiteren Arbeitsgruppe (Lai et al., 1984)

weitgehend bestätigt. Auf die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten wird in der Diskussion weiter eingegangen.

1.4 Problemstellung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte festgestellt werden, wie mit Hilfe der "Target Size Analysis" die Größe des Opioidrezeptors bestimmt werden kann. Dabei sollte auch untersucht werden, ob unterschiedlich große Einheiten für die Bindung von antagonistischen und agonistischen Liganden benötigt werden. Besonderes Interesse galt der Frage, ob die verschiedenen Opioidrezeptortypen, wie sie mittels Bindungsstudien unterschieden werden können, auch in ihrer molekularen Größe unterschieden werden können. Schließlich wurde noch untersucht, ob die allosterische Modulation der Opioidrezeptorbindung einen Einfluß auf die mit Target Size Analysis bestimmte Größe hat.

2. Methode

2.1 Theorie der "Target Size Analysis"

2.1.1 Physikalische Grundlagen

2.1.1.1 Die Treffertheorie

Um die spezielle Wirkungsweise von ionisierenden Strahlen auf Materie zu erklären, entwickelten in den zwanziger Jahren Dessauer (1922) und Crowther (1924) unabhängig voneinander die sogenannte "Treffertheorie". Bei der Wirkung von üblichen toxischen Substanzen existiert ein Schwellenwert, unter dem keine Zerstörung stattfindet. Im Gegensatz dazu üben ionisierende Strahlen bereits bei geringer Dosis ihre Wirkung aus; bei Erhöhung der Dosis steigt nur die Wahrscheinlichkeit, mit der die prinzipiell gleichartige Wirkung auftritt. Die Treffertheorie geht davon aus, daß Strahlen, wenn sie durch Materie hindurch gehen, in diskreten Ereignissen, den sogenannten "Treffern", definierte Energiemengen auf die Materie übertragen. Für das Zustandekommen eines Treffers innerhalb einer bestimmten Raumeinheit (Wirkungsvolumen) ist der Durchgang des Strahlteilchens durch dieses Volumen eine notwendige Voraussetzung. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Durchganges hängt einmal von der Menge der bestrahlenden Teilchen (Dosis), zum anderen von der Größe der betrachteten Raumeinheit ab. Außerdem findet aber ein Treffer während des Durchgangs des Strahls durch das besagte Volumen wiederum nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit statt. Diese Wahrscheinlichkeit (Wirkwahrscheinlichkeit) hängt vor allem von der Art der verwendeten Strahlung und der Dichte des bestrahlten Materials ab (siehe Kapitel 2.2.2 , LET-Wert). Die Natur von solchen Treffereignissen wurde zunächst nicht genauer definiert; man nahm die Ionisation eines Atoms an, daher wurde auch der Name "primäre Ionisationen" geprägt. Diese Ionisationen treten zufällig, und völlig gleichmäßig innerhalb des bestrahlten Materials verteilt, auf. Damit gilt die Poisson-

verteilung, mit der sich die Wahrscheinlichkeit für 1, 2,n solcher Ereignisse pro Rauminhalt berechnen läßt:

$$P(n) = \frac{e^{-x} (x)^n}{n!} \quad (I)$$

wobei x von der Anzahl der Ionisationen innerhalb der betrachteten Raumeinheit abhängt und somit eine Funktion der applizierten Dosis sowie des Volumens V ist: $x \approx V \cdot D$, d.h. $x = k \cdot V \cdot D$.

2.1.1.2 Strahlenwirkung auf Materie

Primäre Energieabsorption:

Beim Durchgang von energiereichen Strahlen durch Materie treten Wechselwirkungen zwischen den Strahlteilchen und den Elektronen der Atomhüllen auf¹. Als Folge solcher Wechselwirkungen treten sowohl Molekülanregungen, wie auch Ionisationen auf (Bielski und Gebicki, 1977). Während bei Molekülanregungen die Energie meist wieder ohne Molekülzersetzung in Form von Wärme abgegeben wird, wird bei einer Ionisation ein Valenzelektron aus dem Atom herausgerissen. Dieses "Sekundärelektron" besitzt nur geringe kinetische Energie und damit auch eine geringe Reichweite. In unmittelbarer Nähe seiner Entstehung, d.h. der primären Ionisation kann es zu einer weiteren Ionisation kommen (Cluster); bereits in geringer Entfernung ist das Sekundärelektron aber soweit abgebremst, daß es seine Energie meist in Molekülanregungen abgibt. Da Molekülanregungen bei Proteinen normalerweise eine sehr geringe Wirkwahrscheinlichkeit zeigen, kann ihr Effekt in der Strahlenbiologie im Vergleich zu dem Effekt der primären Ionisationen vernachlässigt werden

¹Ein Treffer im Atomkern ist erstens wegen dessen geringer Größe nur wenig wahrscheinlich, und zweitens erst bei Elektronen einer Energie von über 10 MeV zu beobachten.

(Alexander, 1961; Hutchinson und Pollard 1961). Die wirksame Energieabgabe bei einem Treffer ist also auf einen Raum von wenigen $\text{\AA}^3$ beschränkt (Jung, 1984). Für eine Größenbestimmung durch die Target Size Analysis entziehen sich daher - wegen der zu geringen "Auflösung" der Methode - Moleküle, deren Größe unter 1.000 Da liegt.

Direkte Strahleneffekte:

Von einem direkten Strahleneffekt spricht man, wenn das Molekül, das primär die Energie absorbiert hat (getroffen wurde), selbst eine chemische Umwandlung erfährt (Dertinger und Jung, 1969; Streffer, 1969). Die häufigste direkte Strahlenreaktion ist die Zerlegung des getroffenen Moleküls in mehrere Bestandteile. Dabei muß nicht immer diejenige Bindung aufgespalten werden, an der die primäre Ionisation stattfand; vielmehr kann es innerhalb des Moleküls zu einer Energiewanderung kommen, wodurch die Energie entlang kovalenter Bindungen, bis zu einer labilen Stelle im Molekül (= Wirkort) gelangt und dort zum Bruch der Bindung führt. Bei Bestrahlung von Proteinen in festem Zustand wurde als Haupteffekt der Radiolyse das Aufbrechen von Peptidverbindungen, sowie ein Auffalten (=Denaturierung) der Proteine festgestellt (Garrison et al., 1967; Friedberg, 1969). Dieser Verlust der Molekülstruktur durch ionisierende Strahlen wurde auch mit einer eng lokalisierten Hitzedenaturierung verglichen (vgl. den von Dessauer eingeführten Begriff der "Punktwärme").

Die Energiemigration ist normalerweise innerhalb eines Moleküls begrenzt, da die Weiterleitung über kovalente Bindungen erfolgt. Die Frage nach einer intermolekularen Energieübertragung, d.h. daß absorbierte Energie auf ein benachbartes Molekül übertragen wird, stellt in der Strahlenbiologie noch immer einen Streitpunkt dar. Experimentell konnten nur einige ganz spezielle Fälle untersucht werden. Während einige Versuche gegen einen generellen Energietransfer sprechen (Kempner und Miller, 1983), ist dies z.B. in

Szintillatorflüssigkeit sicherlich der Fall. Daß ein solches Ereignis auch in Proteinmischungen auftreten kann, erscheint aber nicht wahrscheinlich (Dertinger und Jung, 1969; Sommermeyer, 1959).

Indirekte Strahleneffekte:

Indirekte Strahleneffekte werden durch die chemische Reaktion von hochreaktiven, durch direkte Strahlungseffekte erzeugten Radikalen, mit selbst nicht direkt getroffenen Molekülen hervorgerufen. Es handelt sich hierbei um eine chemische Folgereaktion, die vom physikalischen Ereignis der Energieabsorption unabhängig ist. Sie hängt deshalb nicht von der Größe des zerstörten Moleküls, sondern von dessen chemischer Reaktivität und der Menge sowie Art der Begleitmoleküle ab.

Eine schematische Darstellung der verschiedenen Strahleneffekte ist in Abb. 1 wiedergegeben (verändert nach Dertinger und Jung, 1969):

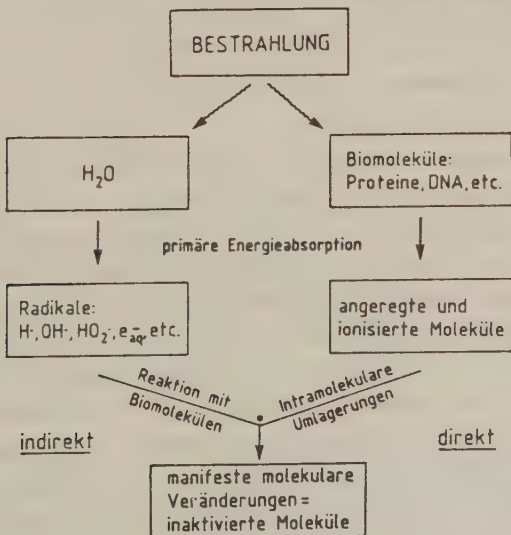


Abb. 1

2.1.1.3 Grundgedanke der Target Size Analysis

Basierend auf dem Trefferprinzip formulierte Lea (1946) in den vierziger Jahren die sogenannte "Target Size Analysis". Er ging dabei von der Überlegung aus, daß bereits ein Trefferereignis an irgendeiner Stelle eines Moleküls ausreicht, um dessen biologische Funktion völlig zu zerstören. Direkte Strahleneffekte folgen dabei einem "Alles-oder-nichts-Prinzip". Dies bedeutet, daß ein Treffer innerhalb einer Struktur zu deren vollständigen Zerstörung führt; daß aber andererseits ein Treffer an irgendeiner anderen Stelle der Probe die untersuchte Molekülstruktur völlig unbeeinflusst läßt. Die Energie, die vom Strahl bei einem Treffer auf das Molekül übertragen wird, reicht aus, um kovalente Bindungen aufzubrechen, und Elektronen aus dem Molekül herauszureißen (Ionisation). Das Molekül verliert durch eine solche "Denaturierung" seine spezifische Struktur und somit auch seine an diese Struktur gekoppelte biologische Funktion. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Struktur des Volumens V nach Bestrahlung mit der Dosis D noch funktionsfähig ist, also keinen einzigen Treffer abbekommen hat ($n = 0$), wird nach der Formel (I) angegeben mit: (da $0! = 1$ und $x^0 = 1$)

$$p(0) = \exp^{-k \cdot V \cdot D} \quad (II)$$

Demnach hängt die Treffwahrscheinlichkeit (p) von der Größe des Treffbereichs (V = Wirkungsvolumen) ab. Je größer nun die Struktur ist, die eine bestimmte Funktion ausübt, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, daß sie bei einer bestimmten Dosis "getroffen" wird. Aus diesen einfachen Überlegungen leitet sich die Idee ab, aus der "Überlebensrate" einer bestimmten biologische Funktion nach Bestrahlung auf die Größe des sogenannten Wirkungsvolumens zu schließen, d.h. auf die Größe der Struktur, innerhalb derer ein Treffer zum Verlust der Funktion führt. Dabei geht die Theorie natürlich von der Voraussetzung aus, daß jegliche nach der Bestrahlung noch in der Probe meßbare Aktivität von Molekülen ausgeübt wird, die nicht getroffen wurden (d.h. $n = 0$). Hat also eine Probe eine bestimmte Anzahl biologisch

aktiver Moleküle A_0 , und wird sie dann mit der Dosis D bestrahlt, so berechnen sich die nach der Bestrahlung noch aktiven Moleküle d.h. ($n = 0$) nach der Formel (II) mit

$$A = A_0 \cdot \exp^{-k \cdot V \cdot D} \quad (III)$$

Die Menge der intakt bleibenden Moleküle und somit die Aktivität der Probe nimmt also logarithmisch mit steigender Dosis ab. Dabei ist die Steigung dieser logarithmischen Inaktivierungsfunktion proportional zum Volumen V des aktiven Moleküls ($s = k \cdot V$).

2.1.2 Berechnung der molekularen Größe

Um aus der Inaktivierungsfunktion (III) die molekulare Größe (m) in Dalton zu berechnen, stellten Kepner und Marcey (1968) folgende Gleichung auf:

$$m = 6,4 \times 10^{11} \times 1/D_{37} \quad (IV)$$

wobei als D_{37} die Dosis (gemessen in rad) bezeichnet ist, bei der noch 37% der Ausgangsaktivität erhalten bleibt. Der Wert $1/D_{37}$ wurde statt der Steigung s verwendet, da er aus der graphischen Darstellung der Inaktivierungskurve leicht zu ermitteln ist. Dabei gilt:

$$\text{Aus III folgt:} \quad A/A_0 = \exp^{-k \cdot V \cdot D}$$

$$\text{und da } s = k \cdot V \text{ folgt} \quad A/A_0 = \exp^{-s \cdot D}$$

$$\ln (A/A_0) = -s \cdot D$$

$$\text{Da nach Definition:} \quad \ln (0,37) = -s \cdot D_{37}$$

$$\text{und da } \ln (0,37) = -1$$

$$s = 1/D_{37}$$

Der Faktor $6,4 \times 10^{11}$ wurde empirisch aus dem Vergleich von Inaktivierungskurven von mehreren Molekülen mit bekannter Größe gewonnen. Die Dosis D , hier gemessen in rad (oder in SI-Einheiten: Gy, wobei $100 \text{ rad} = 1 \text{ Gy}$) gibt die Energie

an, die in der Probe aufgenommen wird. Der Wert x in der Formel (I) hingegen, hängt von der Anzahl der Ionisationen im Volumen V ab. Da die Energiemenge, die pro Ionisation übertragen wird, in Feststoffen noch nicht genau gemessen werden konnte, war dieser Wert die einzige Unbekannte in der Molekulargewichtsbestimmung. Ausgehend von dem empirisch durch Vergleich bekannter Moleküle gewonnenen Wert $6,4 \times 10^{11}$ rechneten Kepner und Marcey dann zurück:

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g (Definition)}$$

$$1 \text{ rad} = 6,24 \times 10^{13} \text{ eV/g}$$

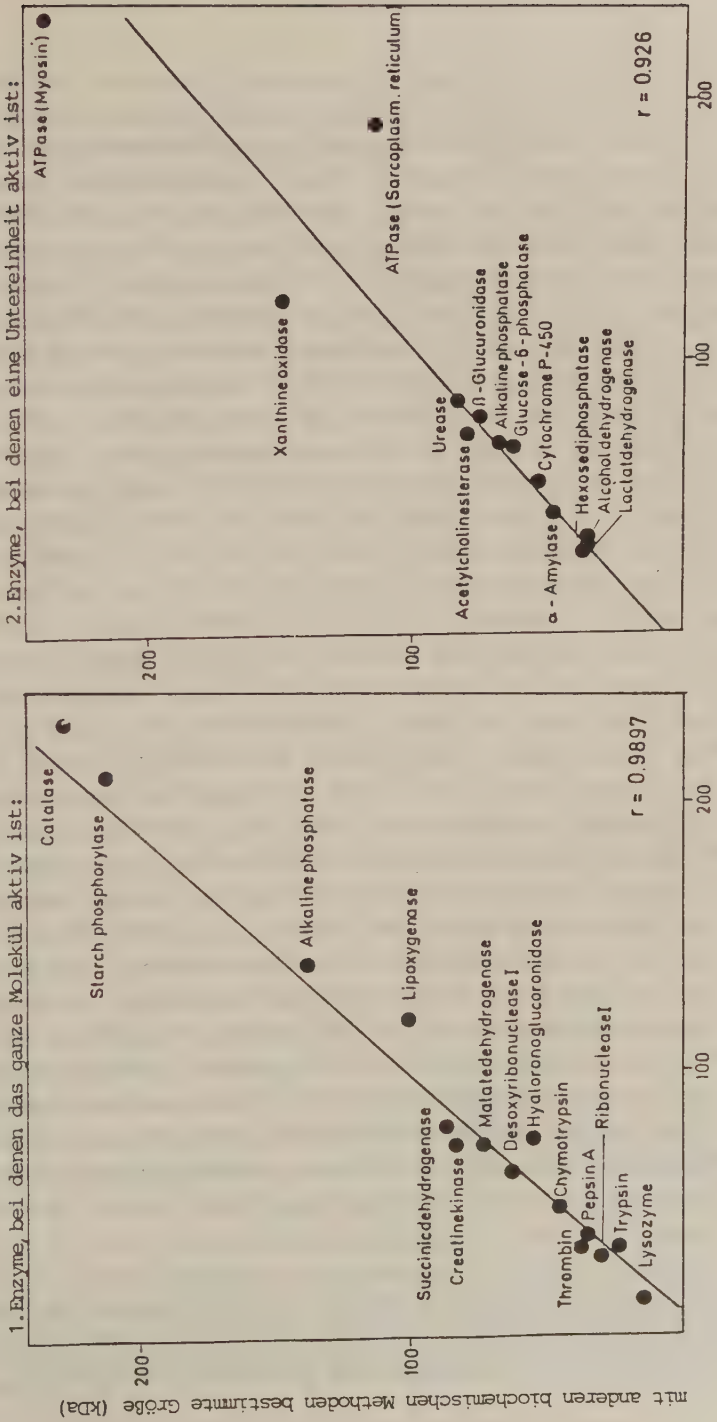
$$1 \text{ rad} = 1,0335 \times 10^{-10} \text{ eV/dalton}$$

Wenn also nach Kepner und Marcey für 1 rad $6,4 \times 10^{11}$ Ionisationen angenommen werden, berechnet sich folglich die Energieübertragung pro Ionisation mit: 66,44 eV/Dalton (1500 kcal/mol). Dieser Wert stimmt überraschend gut überein mit dem von Pollard (Pollard et al., 1955) angegebenen Wert (60 eV), den er aus an Gasen gemessenen Daten ableitete. Diese Übereinstimmung deutet darauf hin, daß die empirisch bestimmte Formel von Kepner und Marcey bestätigt werden kann.

In einer Übersichtsarbeit haben zehn Jahre später Kempner und Schlegel (1979) überprüft, inwieweit sich die Formel (IV) bei der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bewährte, und sie konnten für 23 Enzyme, deren Molekulargewicht inzwischen sowohl mit der "Target Size Analysis", als auch mit anderen biochemischen Methoden aufgeklärt war, eine Übereinstimmung der Größen der Moleküle oder ihrer Untereinheiten feststellen (Abb. 2). Nur in einem einzigen Fall, dem Enzym Papain, entsprach die mit der Strahleninaktivierungsmethode berechnete Größe keiner molekularen Einheit.

Abb. 2 : VERGLEICH DER ENZYMGRÖßEN, DIE MIT TARGET SIZE UND MIT ANDEREN METHODEN BESTIMMT WURDEN:

(Daten nach Kempner und Schlegel, 1979)



2.1.3 Temperaturabhängigkeit

Bei einem Vergleich von Inaktivierungsdaten, die mit bei verschiedenen Temperaturen bestrahlten Proben erhoben wurden, stellte sich heraus, daß der Bestrahlungseffekt temperaturabhängig ist (Setlow und Doyle, 1953). Da die Formel (IV) für Raumtemperatur aufgestellt wurde (Kepner und Marcey, 1968) mußte sie folglich um einen temperaturabhängigen Faktor k_T erweitert werden. Bereits Pollard (Pollard et al., 1955) hatte auf diese Temperaturabhängigkeit hingewiesen. Er stellte die Theorie auf, daß die Energiemigration innerhalb des Moleküles temperaturabhängig sein könnte, daß z.B. die niedrige Temperatur eine Art Stabilisierung des Moleküls zur Folge hätte, und insofern eine primäre Ionisation nur bei Übertragung von mehr als den der Formel (IV) zugrunde liegenden Wert von 66 eV/ Ionisation zustande kommen könnte¹. Analog reichten bei höheren Temperaturen bereits geringere Mengen Energie aus, um zu einer Ionisation zu führen. Pollard wies aber ausdrücklich darauf hin, daß diese Hypothese jeglicher experimenteller Grundlage entbehre, und forderte die weitere Untersuchung dieser Frage. Auch 30 Jahre später hält Jung (1984), ohne nähere Erläuterungen geben zu können, den Wert der "Ionisationsausbeute" für den einzigen Parameter der Formel (I), der wahrscheinlich temperaturabhängig ist. Eine experimentelle Überprüfung steht jedoch weiterhin aus. Obwohl also noch keine Begründung für den Temperatureffekt gefunden wurde, stellt dieser Punkt bei der Molekulargewichtsbestimmung kein allzu großes Problem dar. Kempner und Haigler (1982), die die Temperaturabhängigkeit systematisch untersuchten, entwickelten - wieder aus rein empirischen Daten - den Temperaturfaktor k_T , mittels dessen Inaktivierungsdaten von bei verschiedenen Temperaturen bestrahlten Proben zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet werden können.

¹Von den 66 eV, die übertragen werden, um eine Ionisation hervorzurufen, werden nur etwa die Hälfte zum Herauslösen und Beschleunigen des Valenzelektrons verwendet. Die andere Hälfte führt zu Excitationen und schließlich zu Erwärmung.

Um eine eventuelle Erhöhung des Fehlers in der Molekulargewichtsbestimmung durch diese Einführung verschiedener Proportionalitätsfaktoren zu umgehen, schlugen Lo et al. (1982) vor, Molekulargewichte nur im Vergleich mit internen Standardmolekülen anzugeben. Das heißt, statt die Formel (IV) mit entsprechendem Temperaturfaktor zu verwenden, bestimmten sie die Steigungen der Inaktivierungskurven für einige Enzyme bekannten Molekulargewichts und leiteten die Größe des untersuchten Moleküls aus dem Vergleich der für dieses gemessene Steigung ab. Diese Methode hat den Vorteil, daß sich die oft mühsame Dosisbestimmung erübrigt. Bei genauer Dosis- und Temperaturkontrolle kann jedoch genauso gut die Formel von Kepner und Marcey angewendet werden, wenn die Methodik durch Größenbestimmung eines "Markermoleküls" kontrolliert wird.

2.2 Methodik der Bestrahlung

2.2.1 Die Probe

Der Einfluß der Beschaffenheit der bestrahlten Materie - und dabei vor allem der Wassergehalt der Probe während der Bestrahlung - auf die Strahleninaktivierung wurde bereits in den dreißiger Jahren von Fricke (1934) aufgezeigt. Wie oben ausgeführt (Kapitel 2.1.1.2), kann dies auf die zusätzliche Zerstörung der untersuchten Moleküle durch indirekte Strahleneffekte zurückgeführt werden. Die durch Radiolyse von Wasser entstehenden hochreaktiven Produkte, wie Sauerstoffradikale, Wasserstoffradikale, hydratisierte Elektronen, OH^- oder H^+ (Bielski und Gebicki, 1977) gelangen durch Diffusion zu Molekülen, die vom Ort der primären Ionisation weit entfernt sind, und zerstören diese durch chemische Reaktion. Die Bildung solcher Radiolyseprodukte kann durch Trocknen der Probe vor der Bestrahlung verhindert werden. Zum Trocknen von hitzelabilem biologischem Material eignet sich vor allem das schonende Verfahren der Gefriertrocknung. Dadurch

entsteht allerdings ein poröser Schaum, in dem die Diffusion von Radiolyseprodukten der atmosphärischen Gase möglich ist (O_2 und N_2 können durch Bestrahlung in O_3 , N oder O zerlegt werden). Um "sekundäre Inaktivierung" durch solche Produkte auszuschließen, muß in einigen Fällen die lyophilisierte Probe im Vakuum oder in (strahlen)inerten Gasen wie Argon oder Helium bestrahlt werden.

Auch bei Bestrahlung von organischen Verbindungen entstehen Radikale (Wasserstoffradikale), die in der trockenen Probe zu anderen Biomolekülen diffundieren können. Dort kann die Anlagerung an Doppelbindungen zur Spaltung dieser Moleküle führen (Dertinger und Jung, 1969).

Bei Bestrahlung von gefrorenen Proben kommt es zwar auch zur Radiolyse von Wasser- und anderen Molekülen, die Diffusion der entstehenden Radikale ist aber unterbunden. Somit reagieren sie am Ort des primären Strahlenereignisses weiter, und führen nicht zu einer Zerstörung von "nicht getroffenen" Molekülen der Probe. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß die Probe nach Bestrahlung genügend lange in gefrorenem Zustand behalten wird, damit die entstandenen Radikale noch am Ort des primären Strahlenereignisses fixiert werden, bevor durch Auftauen eine Diffusion wieder ermöglicht wird.

Bestrahlung einer festen Probe (getrocknet oder gefroren) schließt indirekte Strahleneffekte nicht vollständig aus, sondern minimiert diese lediglich (und zwar in unterschiedlichem Maße). Wenn dabei Bestrahlung in getrocknetem bzw. in gefrorenem Zustand das gleiche Ergebnis liefert, kann dies auf eine weitgehende Abwesenheit indirekter Strahleneffekte hinweisen. Da die Unterscheidung zwischen diesen beiden Bestrahlungseffekten (direkt - indirekt) essentiell für die Target Size Analysis ist, ist es ratsam, durch weitere Versuche eine Beteiligung von indirekten Effekten auszuschließen.

Eine einfache Unterscheidungsmöglichkeit ist der sogenannte "Verdünnungstest" (Alexander, 1961; Dale, 1943): Direkte Strahleneffekte sind unabhängig von der Ausgangskonzentration des untersuchten Moleküls A_0 , während chemische Reaktionen, zu denen die indirekten Effekte gehören, von der Konzentration der Reaktionspartner abhängen. Daher können sogenannte Verdünnungsversuche zur Klärung dieser Frage beitragen. Ist die Inaktivierung durch Bestrahlung von der Ausgangskonzentration des untersuchten Moleküls abhängig, so ist dies nach Sommermeyer (1959) ein "untrügliches Zeichen für die Beteiligung indirekter Effekte". Das Prinzip dieser Verdünnungstests¹ beruht darauf, daß bei stärkerer Verdünnung im Verhältnis zum untersuchten Molekül mehr Begleitmoleküle (H_2O) in der Probe durch Radiolyse zerstört werden. Somit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion der Radiolyseprodukte mit den intakten, untersuchten Molekülen. Außerdem kann durch eine Erhöhung der unspezifischen Begleitmoleküle (z.B. Rinderserumeiweiß BSA) die Menge der potentiellen Reaktionspartner für die aktiven Radiolyseprodukte erhöht werden. Dadurch reduziert sich die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit den untersuchten Molekülen.

Neben einem solchen unspezifischen Schutz vor indirekten Effekten können auch spezifischere Schutzstoffe zugesetzt werden, die gezielt um die Radiolyseprodukte konkurrieren. In der Radiobiologie ist die Tatsache, daß bestimmte Substanzen abschwächend (Protektion) auf die Strahleneffekte wirken, gut untersucht. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Radikalfänger oder antioxidativ wirkende Substanzen, die eine Verminderung der indirekten Strahleneffekte bewirken. Prinzipiell ist auch der umgekehrte Mechanismus einer Induktion der indirekten Effekte durch Zugabe bestimmter Substanzen möglich (Radiosensibilisierung). Daher muß, ob-

¹In diesem Zusammenhang ist ein von Schlegel (1983) erwähntes Phänomen zu beachten, daß bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (unter 1 µg/ml Protein) eine elektrostatische Aufladung (dosisabhängig) zu Adsorptionserscheinungen an einem gläsernen Probenbehälter führen kann, und hiermit eine steilere Inaktivierungskurve vorgetäuscht wird.

wohl die Target Size Analysis sich prinzipiell dazu eignet, Größenbestimmungen von Molekülen ohne deren vorhergehende Reinigung vorzunehmen, dennoch beachtet werden, daß Begleitstoffe zu Verfälschungen durch Protektion oder Sensibilisierung führen können (Alexander, 1961; Braams et al., 1958). Eine Untersuchung unter Zugabe von Schutzstoffen und die oben erwähnten Verdünnungsversuche sind daher zur Überprüfung, ob indirekte Effekte beteiligt sind, angezeigt.

2.2.2 Der Strahl

Es können verschiedene Strahlenarten verwendet werden; allerdings muß darauf geachtet werden, daß die Energieübertragung bei einem Treffer hoch genug ist, um zu einer primären Ionisation zu führen. Svedberg experimentierte bereits 1939 mit UV-Bestrahlung zur Molekülgrößenbestimmung; allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, mit der diese Strahlen zur Ionisation führen, zu gering (Hutchinson und Pollard, 1961). Die UV-Lichtinaktivierung erfolgt hauptsächlich durch Molekülanregungen, wobei labile chemische Bindungen genügend Aktivierungsenergie erhalten, um aufzubrechen. Dieses Ereignis ist grundsätzlich verschieden von Ionisationen, wie sie bei höher energetischen Strahlen auftreten. Obwohl im Prinzip alle hochenergetischen, ionisierenden Strahlen verwendet werden können, hat doch die Bestrahlung mit schnellen Elektronen gewisse Vorteile vor z.B. Röntgenstrahlen, α -Teilchen, Neutronen- oder Deuteronenstrahlung. Die benötigten Energien und Dosiswerte lassen sich bei Elektronen in Linearbeschleunigern leicht erreichen. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Energie, d.h. die Geschwindigkeit der beschleunigten Elektronen, hoch genug gewählt wird, damit die Durchdringungstiefe des Strahls größer ist, als die Dicke der Probenschicht. Die Elektronen dürfen bei der Bestrahlung nicht soweit abgebremst werden, daß sie in der Materie "steckenbleiben", da ein solches "eingefangenes" Elektron nicht mehr eine genau definierte Menge Energie abgibt, sondern seine gesamte kinetische Energie in der

Materie verliert. Dadurch käme es neben der primären Ionisation zu weiteren, unerwünschten Zerstörungen.

Von der Energie des Strahles hängt außer seiner Reichweite auch der sogenannte LET-Wert (Linearer Energietransfer) ab. Dieser LET-Wert gibt an, wieviele Ionisationen im Durchschnitt auf einer Bahn von $100 \text{ \AA}$ durch die Materie (definierter Dichte) stattfinden. Schnelle Elektronen haben einen sehr niedrigen LET-Wert, da die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion des Strahlenteilchens mit einem Elektron der bestrahlten Materie gering ist. Diese hängt außer von der Entfernung zwischen Strahlteilchen und Elektron des bestrahlten Moleküls, auch von der Masse des Strahlteilchens und dessen Geschwindigkeit ab. Elektronen der Energie 2 MeV produzieren in biologischem Material (wobei eine Dichte von 1 g/cm^3 angenommen wird) ca. 1 Ionisation pro $4000\text{-}5000 \text{ \AA}$. Bei dichter ionisierenden Strahlen, wie z.B. Deuteronen der Energie 1 MeV tritt bereits alle $20 \text{ \AA}$ eine Ionisation auf. In einem solchen Fall spielt für die Zerstörung des Moleküls nicht mehr sein Volumen, sondern nur mehr seine Oberfläche eine Rolle, da, sobald ein Strahlteilchen in den Bereich des fraglichen Moleküls eintritt, die Wahrscheinlichkeit einer Ionisation (= einer Zerstörung) gleich 1 ist. Die Verweildauer des Teilchens innerhalb des Moleküls wird also irrelevant. Diese Tatsache kann ausgenutzt werden, um durch Kombination der Inaktivierungsdaten mit Strahlen verschieden hoher LET- Werte sowohl die Oberfläche wie auch das Volumen eines Moleküls zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf seine Form zu ziehen (Hutchinson und Pollard, 1961; Marshall et al., 1970; Pollard et al., 1955).

2.2.3 Dosisapplikation

Die Zeit, in welcher eine bestimmte Dosis D appliziert wird, hat keinerlei Einfluß auf die direkte Strahleninaktivierung, und sollte daher auch nicht die Größenbestimmung beeinflussen. Um festzustellen, ob während der Bestrahlung zeitabhängige Effekte, wie z.B. Erholung (repair) und andere

eine Rolle spielen, ist es wichtig, verschiedene Dosistraten miteinander zu vergleichen. Es wurde auch beschrieben (Alexander, 1961; Butler und Robins, 1962; Hutchinson und Watts, 1961), daß z.B. Oxidationseffekte durch einen Vergleich verschiedener Dosistraten demaskiert werden können, da die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs einen limitierenden Faktor bei der Oxidation durch Luftsauerstoff darstellt. Wird eine bestimmte Dosis in sehr kurzer Zeit appliziert, so wird der Oxidationseffekt in geringerem Maß auftreten, als bei Bestrahlung mit derselben Dosis innerhalb sehr viel längerer Zeit, die gewährleistet, daß genügend Sauerstoff zum Wirkort nachdiffundieren kann.

Ebenfalls abhängig von der Zeit, in welcher eine bestimmte Dosis appliziert wird, ist der Temperaturanstieg der Probe durch die Bestrahlung. Obwohl ein Großteil der Energie in der Probe in Wärme umgewandelt wird, ist der Temperaturanstieg relativ gering (Alexander, 1961), so daß mit thermischer Inaktivierung nicht gerechnet werden muß. Temperaturkonstanz ist aber ein sehr wichtiger Faktor, da sowohl direkte wie auch indirekte Effekte temperaturabhängig sind (siehe Kapitel 2.1.4). Insofern ist vor allem bei gefrorenen Proben ein ausreichendes Kühlsystem erforderlich. Auch hier kann ein Vergleich verschiedener Dosistraten Auskunft über die Temperaturkonstanz geben, denn zum Abtransport der entstandenen Wärme ist eine gewisse Zeit nötig; man bestrahlt mit einer bestimmten Dosis kontinuierlich und innerhalb kurzer Zeit und vergleicht den resultierenden Bestrahlungseffekt mit demjenigen in Proben, denen dieselbe Dosis langsamer, z.B. in Raten mit ausführlichen Kühlintervallen, appliziert wurde. Ist der Zerstörungsgrad nach schneller kontinuierlicher Applikation nicht größer, als nach langsamer oder gar unterbrochener Applikation, weist dies darauf hin, daß das Kühlsystem ausreicht, um Temperaturkonstanz zu erhalten.

2.3 Interpretation der Inaktivierungskurven

2.3.1 Verschiedene Inaktivierungskurven

Als Inaktivierungskurve wird die halblogarithmische Darstellung der nach Bestrahlung gemessenen Probenaktivität als Funktion der applizierten Strahlendosis bezeichnet. Die Berechnung des Molekulargewichts in Dalton aus der Steigung dieser Kurve, wie sie unter 2.1.2 beschrieben wurde, geht von dem einfachsten Fall aus, daß die nach der Bestrahlung gemessene Restaktivität A unmittelbar und ausschließlich von einer homogenen Molekülpopulation ausgeht. Unter dieser Voraussetzung ergibt die Inaktivierungskurve nach Formel (V) eine Gerade (monoexponentielle Inaktivierungskurve, siehe Abb. 3a). Die Steigung dieser Geraden entspricht der Größe der molekularen Struktur, die intakt bleiben muß, um die gemessene Aktivität A ausüben zu können. Es soll darauf hingewiesen werden, daß dabei nicht unterschieden wird, ob diese Struktur aus einem einzelnen Molekül besteht, oder ob sie sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt, die alle intakt bleiben müssen, damit die Aktivität A gewährleistet ist (Kempner und Schlegel, 1979; siehe auch Abb. 2). Solche eine funktionale Einheit bildende Untereinheiten müssen nicht notwendig auch räumlich zusammenhängend vorliegen.

Wird die untersuchte Aktivität A im gleichen Maße von mehreren unabhängigen, unterschiedlichen Molekülpopulationen ausgeübt, so setzt sich die erhaltene Inaktivierungskurve aus den Teilinaktivierungskurven der beteiligten Molekülpopulationen zusammen. Diese mehrphasische Inaktivierung ergibt bei halblogarithmischer Darstellung eine konkav gekrümmte Inaktivierungskurve (Abb. 3b). Üben z.B. die beiden Moleküle B und C die Aktivität A aus, kann diese Kurve mit der Formel

$$A = B_0 \cdot \exp^{-s_B D} + C_0 \cdot \exp^{-s_C D}$$

in ihre beiden Komponenten zerlegt werden, wobei B_0 und C_0

jeweils den Anteil der Moleküle B und C an der Gesamtaktivität A_0 der unbestrahlten Probe darstellen und s_B und s_C den Größen dieser beiden Moleküle entsprechen. Falls mehr als nur zwei verschieden große Moleküle beteiligt sind, erweitert sich die Formel entsprechend.

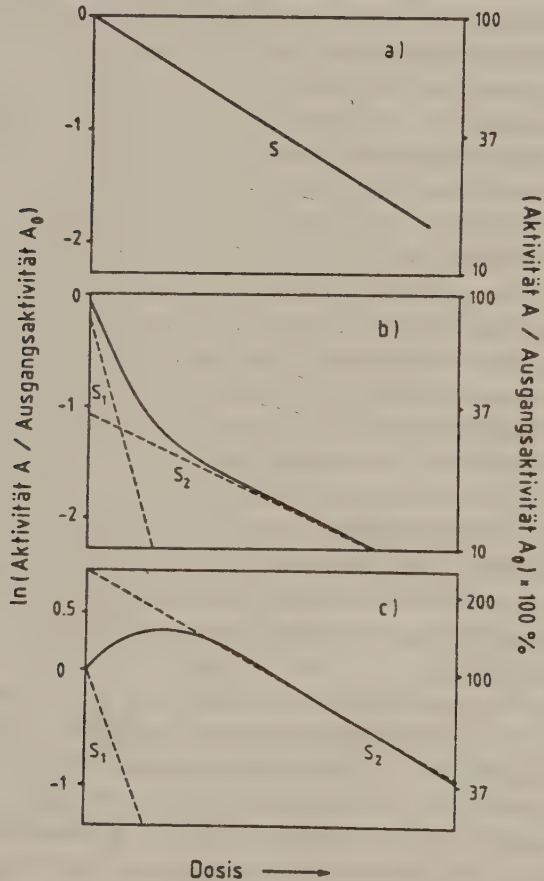


Abb. 3

Außer diesen konkav nach unten gekrümmten Kurven werden auch konvex nach oben gekrümmte Inaktivierungskurven (siehe Abb. 3c) beobachtet. Das einfachste Modell zur Beschreibung dieses zunächst überraschenden Bildes, einer Aktivierung statt Inaktivierung, geht von zwei verschiedenen miteinander interagierenden Molekülen aus: die untersuchte Aktivität A wird von dem Molekül M ausgeübt, welches allerdings von

einem zweiten Molekül I gehemmt wird. Beide können nun durch die Bestrahlung zerstört werden, und zwar entsprechend ihrer Größe. Daraus ergibt sich wegen des Aktivitätsverlusts durch Zerstörung des Moleküls M, und gleichzeitiger Aktivitätssteigerung durch Zerstörung des Inhibitors I eine komplexe Inaktivierungskurve. Mathematisch läßt sich dieses Modell durch folgende Formel beschreiben:

$$A = M_0 \cdot \exp^{-s_M D} - I_0 \cdot \exp^{-s_I D}$$

Ist die Zerstörung des Inhibitors I effizienter als die von M (d.h. wenn I größer ist als M), kommt es zu einer initialen Aktivitätssteigerung des Systems bei niedriger Bestrahlung; bei höherer Bestrahlungsdosis, wenn nahezu kein aktives I mehr vorhanden ist (d.h. $I_0 \exp^{-s_I D}$ in etwa 0), nähert sich die Kurve der einfachen Inaktivierungskurve für das Molekül M an.

Als vierte Möglichkeit von Inaktivierungskurven ist der Typ der Schulterkurven beschrieben worden. Diese können entweder nach einem "Multi-target"- oder einem "Multi-hit"-Modell interpretiert werden. Es soll hier nur auf die Literatur verwiesen werden (Hug und Kellerer, 1966; Hutchinson und Pollard, 1961; Oliver und Shepstone, 1964).

2.3.2 Beurteilung von Inaktivierungskurven

2.3.2.1 Auswirkungen von indirekten Strahleneffekten:

Wie unter 2.2.1 ausgeführt, rufen indirekte Strahleneffekte zusätzliche, von der Größe unabhängige Zerstörungen des untersuchten Moleküls hervor. Tritt eine solche Zerstörung in einer homogenen Molekülpopulation auf, so führt dies zu einer steileren Inaktivierungskurve, die allerdings ihren linearen Verlauf beibehält. Andererseits können auch gekrümmte Inaktivierungskurven hervorgerufen werden, und zwar dann, wenn der indirekte Strahleneffekt limitiert ist. Dies ist möglich, wenn die Anzahl der Probenbestandteile, die die indirekte Zerstörung hervorrufen, begrenzt ist, oder wenn

nur eine Teilpopulation der untersuchten Moleküle exponiert, und somit gegenüber diesen indirekten Effekten sensitiv ist. In diesem Falle wird nur der Anfang der Inaktivierungskurve steiler verlaufen. Ab einer gewissen Dosis sind die indirekten Reaktionen erschöpft, und die Kurve gleicht sich der einfachen Inaktivierungskurve durch direkte Effekte an. Somit täuscht diese Beeinflussung einen Zweikomponentenverlauf vor. Die Steigung der steileren Komponente entspricht dabei der Empfindlichkeit des untersuchten Moleküls gegenüber den indirekten Effekten. Der Anteil dieser Komponente sagt außerdem etwas über das Ausmaß der indirekten Effekte aus. Die Größe des untersuchten Moleküls kann in einem solchen Fall aus der Steigung der zweiten Komponente der Inaktivierungskurve abgeleitet werden, d.h. wenn die indirekten Effekte erschöpft sind.

2.3.2.2 Anforderung an den Test zur Bestimmung des Aktivitätsverlusts in der bestrahlten Probe:

Da von der gemessenen Aktivität direkt auf die Menge der intakt gebliebenen Moleküle geschlossen wird, ist selbstverständlich nur ein Test geeignet, der hohe Spezifität für die Aktivität des untersuchten Moleküls aufweist. Bei Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien kommt daher der unspezifischen Bindung besondere Bedeutung zu, da ein Fehler in ihrer Bestimmung sich in bestrahlten Proben prozentual sehr viel stärker auswirkt, als in Kontrollproben. Die Subtraktion einer falsch bestimmten unspezifischen Bindung kann zu einer Verfälschung der Steigung und auch Krümmung der Inaktivierungskurve führen. Bedeutend in diesem Zusammenhang ist auch das Problem der "Filterbindung", d.h. stereoselektiver Bindung des radioaktiv markierten Liganden an Glasfaserfilter, mit denen in den Bindungsstudien der freie von dem an Rezeptoren gebundenen Ligandenanteil getrennt wird. Da diese Bindungskomponente von der Bestrahlung unabhängig ist, simuliert sie die Existenz eines zusätzlichen Bindungsmoleküls von sehr kleiner Größe, und die Inaktivierungskurve wird durch eine zusätzliche Komponente der Steigung 0 gegen Ende

abgeflacht.

Außer einer hohen Spezifität muß der Test, mit dem der Aktivitätsverlust gemessen wird, auch eine genügend hohe Sensitivität aufweisen, um eine Restaktivität von höchstens 10% der Ausgangsaktivität noch mit ausreichender Genauigkeit bestimmen zu können. Denn, nur wenn die Inaktivierungskurve mindestens eine Dekade umfasst, kann mit genügender Sicherheit entschieden werden, ob es sich um eine monoexponentielle Kurve handelt, oder ob eine Abflachung bei höherer Bestrahlungsdosis vorhanden ist.

2.3.2.3 Target Size Analysis bei interagierenden Molekülen

Wie schon oben erwähnt, wird bei der Target Size Analysis aus der Stärke der gemessenen Aktivität direkt auf die Menge der aktiven Moleküle geschlossen. Wird allerdings die Aktivität des Moleküls A durch zusätzliche Membranbestandteile reguliert, so muß beachtet werden, daß alle Komponenten durch Bestrahlung in Abhängigkeit von ihrer Größe zerstört werden. Daher wird durch Bestrahlung einerseits die Menge des Moleküls A reduziert, andererseits aber auch dessen Regulierung durch eine zweite, ebenfalls bestrahlte Membrankomponente verändert. Damit können außergewöhnlich komplizierte Inaktivierungsmuster entstehen, wobei nicht nur die Größen der einzelnen Komponenten, sondern auch deren Mengenverhältnisse sowie deren relative Wirkstärke eine Rolle spielen. Daher sollte darauf geachtet werden, daß die getestete Aktivität möglichst unmittelbar vom untersuchten Molekül ausgeht. Bei Rezeptoren, z.B., ist die Bindung des Liganden eine unmittelbare Aktivität. Die Effektorantwort, wie z.B. die Veränderung im c-AMP Spiegel, hingegen, wird außer durch den Rezeptor durch noch weitere molekulare Einheiten übermittelt. Daher hängt die Inaktivierung dieser Aktivität von der Größe des Rezeptors sowie von der Größe aller beteiligten Moleküle ab. Eine einfache Addition der Größe aller beteiligten Moleküle ist allerdings nicht zu erwarten. Da die Größe eines im Überschuß vorhandenen Mole-

küls die Inaktivierung weniger beeinflusst, ist auch das stöchiometrische Verhältnis der beteiligten Moleküle bedeutend.

Wenn nicht isolierte Rezeptormoleküle untersucht werden, muß damit gerechnet werden, daß auch die unmittelbare Aktivität der "Bindung" unter der Regulierung durch weitere Membranmoleküle steht. Wenn diese "regulierenden Moleküle" durch Bestrahlung inaktiviert werden, ist eine Veränderung der Bindungseigenschaften des Rezeptors möglich. Daher ist es nötig, bei Rezeptorbindung durch Affinitätsanalysen zu überprüfen, ob eine Veränderung der Affinität durch Bestrahlung auf ein solches Phänomen hinweist.

Eine Berechnung der molekularen Größe eines Moleküls mittels Target Size Analysis ist nur möglich, wenn alle erwähnten Verfälschungsmöglichkeiten wie indirekte Effekte oder Beeinflussung der untersuchten Aktivität durch weitere Membranbestandteile ausgeschlossen werden. Dennoch kann der Nachweis von indirekten Effekten zusätzlich interessant sein, da er ein Hinweis auf eine bestimmte chemische Labilität des untersuchten Moleküls liefert.

Der Vergleich von zwei verschiedenen Funktionen eines Moleküls, einer unmittelbaren und einer distaleren, kann Aufschluß über eine eventuelle regulatorische Beteiligung auch weiterer Moleküle bei einer der beiden Funktionen geben. Die Anwendung der klassischen Target Size Analysis zur Molekulargewichtsbestimmung bei solchen komplexen Inaktivierungskurven (Harmon et al., 1983; Kincaid et al., 1981) stieß mit Recht auf einige Kritik (Hug und Kellerer, 1966; Jung, 1984; Simon et al., 1982; Swillens und Dumont, 1981; Verkman et al., 1984), da dies nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen möglich ist. Obwohl solche komplexen Inaktivierungskurven also für die Berechnung einer molekularen Größe nicht geeignet sind, können sie dennoch von größtem Interesse sein und Hinweise auf funktionelle Zusammenhänge verschiedener Strukturen bieten.

2.4 Experimenteller Teil

2.4.1 Versuchstiere, Materialien, Geräte

Folgende Versuchstiere wurden für diese Arbeit benötigt:

Ratten (Sprague Dawley, 200-300g) und Meerschweinchen (Hartley, 400-550 g) von der Firma IWV (Gelting) sowie Frösche (*Rana esculenta*) von der Firma Stein (Lauingen). Schweinegehirne wurden vom Münchener Schlachthof erhalten.

Zur Bestimmung der Rezeptorbindung wurden folgende radioaktiv markierte Liganden verwendet:

[³H]Bremazocin (32 Ci/mMol), [³H]Ethylketocyclazocin (24,2 Ci/mMol), [³H]Lofentanal (30 Ci/mMol) von New England Nuclear (Dreieich), sowie [³H](D-Ala², D-Leu⁵)Enkephalin (30-40 Ci/mMol), [³H]Diprenorphin (35-45 Ci/mMol), [³H]Naloxon (50-60 Ci/mMol), [³H]Oxymorphon (40 Ci/mMol) und [³H] Flunitrazepam (80 Ci/mMol) von Amersham Buchler (Braunschweig) sowie [³H]Sufentanal (15 Ci/mMol) von Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgien). Für den Aktivitätstest der Acetylcholinesterase wurde [¹⁴C]Acetylcholinjodid (55,3 Ci/mMol) von New England Nuclear verwendet.

Das Peptid [³H](D-Ala², D-Leu⁵)Enkephalin war in destilliertem Wasser in Anwesenheit von Bacitracin und Bestatin gelöst und wurde bei 4°C aufbewahrt. Die übrigen radioaktiv markierten Substanzen wurden in einem Äthanol/Wasser Gemisch bei -20°C aufbewahrt. Die radiochemische Reinheit war mit 95% angegeben.

Die benützten unmarkierten Liganden waren:

Oxymorphon, ein Agonist am μ -Opioidrezeptor (von Boehringer, Mannheim), Naloxon HCl, ein Opioidantagonist mit μ -Präferenz (von Endo Laboratories, Garden City, U.S.A.), Diprenorphin, ein partieller Agonist ohne Typenpräferenz (von Reckett & Colman, Kingston-upon-Hill, U.K.), Ethylketozyclazocin-me-

thansulfonat, das wie Diprenorphin keine Typenpräferenz aufweist (von Sterling-Winthrop Research Institut, New York, USA), Bremazocin, ebenfalls keine ausgeprägte Typenpräferenz (von Sandoz, Basel, Schweiz) und Lofentanil, ein partieller Agonist mit Typenpräferenz vielleicht am μ_1 -Rezeptor (von Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien). Die beiden Benzodiazepinrezeptoragonisten Flunitrazepam und Diazepam wurden uns von Roche (Basel, Schweiz) freundlicherweise überlassen. Die beiden stabilen Enkephalinanaloga (D-Ala², D-Leu⁵)Enkephalin mit leichter δ -Präferenz und (D-Ala², MePhe⁴, Glyol⁵)Enkephalin mit μ -Präferenz wurden von Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen.

Von diesen Substanzen wurden Vorratslösungen der Konzentration 10^{-2} M oder 10^{-3} M in Aqua purificata (Milli-Q Reagent Water System) hergestellt und in Plastikgefäßen in Portionen zu je 100 μ l bei -20°C aufbewahrt. Freie Basen wurden mit Hilfe von HCl in Lösung gebracht. Benzodiazepine wurden in einem Äthanol/H₂O Gemisch gelöst.

Weitere benötigte Substanzen waren das Nukleotid Guanosintriphosphat (GTP), und dessen gegen enzymatische Hydrolyse stabilen Analoga, Guanyl-yl-5-imidodiphosphat (GMP-PNP) und Guanosin-5-(3-O-thio)-triphosphat (GTP γ S) (Boeringer, Mannheim). Die Antioxidantien, Cystein, Dithiothreitol und alpha-Tocopherol wurden von der Fa. Sigma, München, bezogen. Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, jeweils im höchsten Reinheitsgrad, erhalten. Es wurde die Szintillationsflüssigkeit HP/b der Fa. Beckman (München) benutzt.

Bei den Radiorezeptorassays mit [³H]DADLE wurden Bactracin, Bestatin (Fa. Sigma, München) als Proteolyseinhibitoren eingesetzt. Bei der Acetylcholinesterasebestimmung wurden die beiden Butyrylcholinesterasehemmer Tetraisopropylphosphoramid und Ethopropazin (beide Sigma, München) zugesetzt.

Folgende Geräte wurden für diese Studie angefertigt:

Aluminium Bestrahlungsgefäße: 5 cm Durchmesser, 1,5 cm Höhe, 1 mm Wandstärke, 0,3 mm Bodenstärke; In 0,8 cm Höhe waren Gummi O-Ringe zur Befestigung des Aluminiumdeckels (0,3 mm Dicke) eingelassen. In einigen Gefäßen waren in etwa 0,5 cm Höhe zwei gegenüberliegende Kupferröhrchen eingelötet, wodurch ein Gasaustausch innerhalb der Gefäße ermöglicht wurde.

Filtrationsgeräte: Zur Filtration im Radiorezeptorexperiment wurden nach dem Prinzip der Millipor Filtrationstöpfe nachgebaute Geräte verwendet, mit denen gleichzeitig 45 Proben pro Geräte filtriert werden konnten.

2.4.2 Durchführung der Experimente

2.4.2.1 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials zur Bestrahlung

Zur Bestrahlung wurden Serien von jeweils 10 - 15 identischen Proben in den Aluminium-Bestrahlungstöpfen vorbereitet. Dabei wurden drei verschiedene Präparationsarten gewählt:

2.4.2.1.1 Gefriergetrocknete Rattengehirnmembranen

Die Versuchstiere, männliche Sprague Dawley Ratten, wurden mit einer Guillotine getötet. Die Gehirne wurden nach dem Entfernen des Kleinhirns schnell herausgenommen, auf Eis gekühlt und gewogen (auf dieses Feuchtgewicht beziehen sich die nachfolgenden Gewichtsangaben). Das Gewebe wurde dann in der 10fachen Gewichtsmenge mit TRIS/HCl Puffer (ph 7.4; 4°C; 50mM) mit Hilfe eines Ultra-turrax bei maximaler Geschwindigkeit ca. 8 Sekunden lang homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 4°C und 40000g 20 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in TRIS/HCl Puffer resuspendiert. Diese Prozedur wurde zweimal wieder-

holt und das letzte Pellet¹⁾ wiederum in eiskaltem TRIS/HCl Puffer suspendiert und auf eine Konzentration von 100 mg Gewebe pro ml gebracht.

Zu der Membransuspension wurden in einigen Versuchen Substanzen wie DTT oder alpha-Tocopherol hinzugefügt (Konzentration und Art des Zusatzes siehe Ergebnisteil). Unter ständigem Rühren wurden dann Aliquots von 5 ml in die Bestrahlungsgefäße gegeben - dies ergab eine Schichtdicke der Membransuspension von ca. 3 mm - und schnell auf Trockeneis tiefgefroren. Die Proben wurden dann über Nacht lyophilisiert. Es entstand eine schwammartige Schicht, die dem Boden des Bestrahlungsgefäßes anhaftete. Die getrockneten Proben wurden dann in einem evakuierten Exsikkator über Trockenmittel bei +4°C bis zur Bestrahlung aufbewahrt.

2.4.2.1.2 Gefrorene Rattengehirnmembranen

Diese Proben wurden bis auf den Lyophilisierungsschritt wie zuvor beschrieben präpariert. Sie wurden im Gefrierschrank bei -70°C bis zur Bestrahlung aufbewahrt. Die Membrankonzentration in diesen Proben betrug üblicherweise 100 mg Gewebe/ml - außer in den Versuchen, in denen der Einfluß der Membrankonzentration auf das Bestrahlungsergebnis getestet wurde (siehe Ergebnisteil).

2.4.2.1.3 "Intaktes Gehirngewebe"

Neben den oben beschriebenen Membranpräparationen wurden Gehirne verschiedener Spezies auch als nicht homogenisiertes Gewebe bestrahlt. Dazu wurden die gekühlten Gehirne mit Hilfe eines Skalpells in 1 - 2 mm dicke Scheiben zer-

1) Für einige Bestrahlungen wurde das letzte Pellet in Aqua purificata statt TRIS-Puffer aufgenommen, so daß während der Bestrahlung in der lyophilisierten Probe kein TRIS-Salz vorhanden war. Diese Proben wurden nach der Bestrahlung dann mit TRIS-Puffer statt Wasser rehyriert. Diese Versuche zeigten, daß die Anwesenheit von ca. 43 mg TRIS-Salz während der Bestrahlung keinen Einfluß auf den Bestrahlungseffekt hat.

teilt, die dann am Boden der Bestrahlungsgefäße festgefroren wurden (-70°). Hierbei wurde jeweils ein ganzes Rattengehirn (ohne Kleinhirn) pro Bestrahlungsgefäß verwendet, um Unterschiede in der Opioidrezeptormenge und -typenverteilung auf Grund der Verschiedenartigkeiten der einzelnen Hirnareale zu vermeiden. Diese unterschiedliche Verteilung der Opioidrezeptortypen wurde andererseits bei der isolierten Bestrahlung von hypothalamisch-thalamischem Gewebe des Schweinegehirns ausgenützt. Im Falle von Fröschen wurden jeweils 7 Gehirne pro Bestrahlungsgefäß verwendet. Zwischen den Gehirnen gleicher Versuchstiere lag der Unterschied in der Bindungsaktivität unter 5%; er wurde innerhalb jeder Bestrahlungsreihe dadurch kontrolliert, daß in mindestens zwei unbestrahlten Kontrollproben die Ausgangsbindungsaktivität bestimmt wurde.

2.4.2.1.4 Neuroblastoma x Glioma Hybridzellen

Die Mäuseneuroblastoma x Rattenglioma Hybridzelllinie NG 108-15, ein Geschenk von Dr. Nirenberg (Bethesda, USA), wurden in der von Hamprecht (1977) beschriebenen Weise weitergezüchtet. Die Zellen, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt waren, wurden aufgetaut, und ca. 1 - 1,5 Mio. Zellen in 30-50 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 5% fötalem Kälberserum in Falcon T145 Flaschen zum Wachsen gebracht. Um eine Rückmutation in eine der Elternzellen zu vermeiden, wurde dem Wachstumsmedium 10% HAT (100 μ M Hypoxanthine, 10 μ M Aminopterin, 17 μ M Thymidin) zugesetzt. Bei 37°C , 7% CO_2 und einer relativen Feuchtigkeit von 95% wuchsen die Zellen am Boden der Wachstumsflaschen an. Nach ca. 2 - 3 Tagen mußte das Wachstumsmedium erneuert werden, und nach weiteren 1 - 2 Tagen (mit und ohne erneutem Mediumwechsel) bedeckte eine zusammenhängende Schicht den Boden des Gefäßes, die aus ca. 15 Mio. Zellen bestand. Zur Ernte wurde das Medium entfernt, zum leichteren Ablösen der Zellen wurde kalziumfreies PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco) zugesetzt, und die Zellen durch kräftiges Klopfen vom Boden des Gefäßes abgelöst. Durch etwa 10maliges Auf- und Abpipettieren wurden größere Zellaggregate zerteilt. Die

Zellen wurden dann bei 1000 g abzentrifugiert, das Pellet in PBS aufgenommen und ein zweites Mal abzentrifugiert. In einem Aliquot der letzten Zellsuspension wurde die Zellzahl im Phasenkontrastmikroskop bestimmt (Neubauer Zählkammer). Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen lassen durch ihre intakten Membranen keinen Farbstoff in das Zytoplasma dringen und erscheinen deshalb unter dem Mikroskop durchscheinend hell. Tote Zellen dagegen werden blau angefärbt. Üblicherweise lag der Anteil der toten Zellen nicht über 10%. Die geernteten Zellen wurden mit Medium oder PBS auf eine Konzentration von ca. 10^7 Zellen/ml gebracht. Für Versuche, in denen intakte Zellen bestrahlt werden sollten, wurden unter ständigem Rühren Aliquots dieser Zellsuspension in die Bestrahlungsgefäße pipettiert, und bei -70°C gefroren (Probenschichtdicke ca. 3mm). Für lyophilisierte oder gefrorene Zellmembranproben wurde diese Zellsuspension mit einem Ultra-Turrax (maximale Geschwindigkeit ca. 8 Sekunden, 4°C) homogenisiert und, wie für die Präparation der Gehirnmembranen beschrieben, 2mal in TRIS/HCl Puffer (ph 7,4; 4°C , 50 mM) gewaschen. Das letzte Pellet wurde in TRIS/HCl Puffer in einer Konzentration von ca. 10 Mio. Zellen (4-5 mg Protein, bestimmt nach Peterson, 1983)/ ml resuspendiert. Unter ständigem Rühren wurden Aliquots dieser Suspension in die Bestrahlungsgefäße pipettiert. Nach dem Tieffrieren auf Trockeneis wurde ein Teil dieser Proben bei -70°C bis zur Bestrahlung aufbewahrt; andere Proben wurden über Nacht lyophilisiert, und im Exsikkator bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2.2 Die Bestrahlung

2.4.2.2.1 Der Strahl

Die Bestrahlung wurde in Neuherberg bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH mit Hilfe eines van der Graaf'schen Linearbeschleunigers (Typ K 3000, Fa. High Voltage Engineering) durchgeführt. Dabei wurden Elektronen aus einer Hochfrequenzquelle (Wasserstoff als

Betriebsgas) mittels eines Bandgenerator auf eine Energie von 2,5 MeV beschleunigt. Die Dichte des im Beschleuniger produzierten Elektronenstrahlstroms betrug ca. 15-20 μA . Wegen der nicht vollständigen Transmission im Strahlführungssystem standen am Bestrahlungsort noch 10 μA Elektronenstrom zur Verfügung. Die aus dem Beschleuniger mit der gewünschten Energie austretenden Elektronen wurden durch ein ca. 4,5 m langes, ca. 10 cm dickes evakuiertes Rohr bis zum Bestrahlungsort geführt, wobei die Strahlrichtung durch Elektromagneten korrigiert wurde und durch Blenden Randstrahlungen beseitigt wurden. Der Durchmesser dieses Strahls war 1-2 cm. Eine homogene Stromdichteverteilung auf der runden Bestrahlungsfläche von 5 cm Durchmesser wurde durch ein "Scannen" des Strahles erreicht. Dafür wurde der Strahl durch zwei senkrecht zueinander angeordnete Elektromagneten abgelenkt, deren Magnetfelder zeitlich so verschoben wurden, daß der Elektronenstrahl zeilenweise sämtliche Punkte auf der Bestrahlungsfläche überstrich.

2.4.2.2.2 Die Probe

Der Strahl trat aus dem evakuierten Strahlführsystem durch eine dünne Edelstahlfolie aus, und traf hinter einer Graphitblende (zur Ausschaltung von Randstrahlen) auf den Deckel der Probengefäße. Diese 0,3 mm dicke Aluminiumschicht trug zur weiteren Homogenisierung des Strahls bei, die Homogenität des Strahls wurde mit Hilfe einer Polycarbonatfolie überprüft, die vor jedem Bestrahlungstag an Stelle der Probe bestrahlt wurde. Aus der Braunfärbung der Folie konnte die Gleichmäßigkeit des Strahles beurteilt werden; außerdem diente dieser Test zur Überprüfung der genauen Position des Strahls. Nach dem Durchdringen des Deckels und einer etwa 1 cm dicken Luftschicht traf der Strahl auf die ca. 3 mm dicke Probenschicht, die er ganz durchdrang.

Außer in den beschriebenen Aluminiumgefäßen wurden lyophilisierte Proben auch in Polystyrolgefäßen etwa derselben Dimension bestrahlt. Dieser Test zeigte, daß das Material der Bestrahlungsgefäße keinen Einfluß auf die Be-

strahlung hatte. Den Aluminiumgefäßen wurde wegen der günstigeren Wärmeleitung der Vorzug gegeben.

Lyophilisierte Proben wurden bei Raumtemperatur (25°) bestrahlt (bis auf einige Serien, die analog der gefrorenen Proben bei -70°C bestrahlt wurden). Die Temperatur der Proben wurde während der Bestrahlung durch einen Strom kühler Luft, die auf die Bestrahlungsgefäße geblasen wurde, konstant gehalten. Bei der höchsten applizierten Dosis betrug der Temperaturanstieg weniger als 5°C .

Tiefgefrorene Proben wurden während der Bestrahlung durch eine Mischung von Trockeneis und Alkohol auf -70°C gehalten. Abbildung 4 zeigt schematisch die Anordnung: in einer mit Graphit ausgekleideten Bleikammer befand sich hinter der Graphitblende (1) der hölzerne mit Glaswolle (5) isolierte Probenbehälter. Die Probe (2) befand sich in einem zylindrischen Aluminiumbecher, der in einen Kryostaten (bestehend aus einem Aluminium-Kühlblock (3) und der CO_2 /Alkoholmischung (4)) eingelassen war.

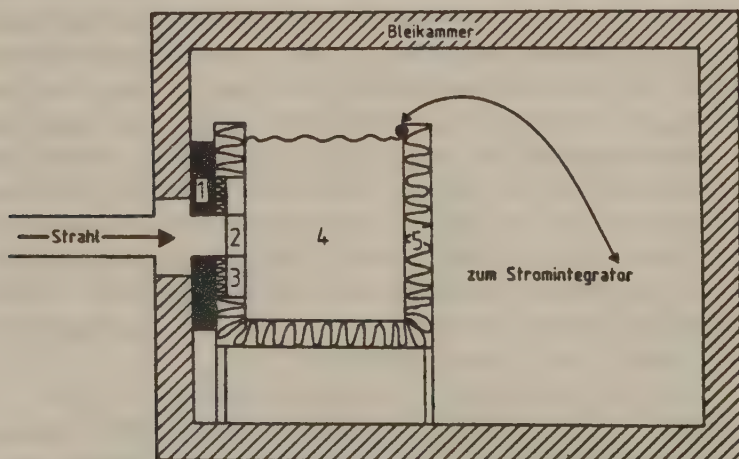


Abb. 4

Die Proben wurden einzeln nacheinander eine bestimmte Zeit lang dem Strahl ausgesetzt. Die Dosisrate (üblicherweise betrug sie bei einer Stromdichte von $15 \mu\text{A}$ etwa 100 kGy pro Minute) hatte, wie Versuche mit höherer bzw. niedrigerer Stromdichte und folglich kürzerer bzw. längerer Expositionszeit zeigten, keinen Einfluß auf den Bestrahlungseffekt. Außerdem wurde dasselbe Bestrahlungsergebnis in Proben gemessen, die 600 kGy innerhalb von ca. 6 Minuten erhielten, im Vergleich zu Proben, die 6mal mit 100 kGy (jeweils mit 5 Minuten Pause auf Trockeneis) bestrahlt wurden. Diese Ergebnisse weisen unter anderem darauf hin, daß das oben beschriebene Kühlsystem ausreichend ist, die Proben während der Bestrahlung auf konstanter Temperatur zu halten.

Die Dosiswerte wurden dadurch variiert, daß die Proben verschieden lange dem konstanten Strahl ausgesetzt wurden. Jede Dosis wurde außerdem mittels eines Stromintegrators kontrolliert. Dieser mißt die elektrische Ladung hinter der Probe, d.h. die Menge der Elektronen, die die Probe während der Bestrahlung passieren. Der Strahl wurde automatisch durch einen Strahlstopper (gekühlter Cu-Block) unterbrochen, sobald die gemessene Ladung einen der gewünschten Dosis entsprechenden Wert erreicht hatte. Die Bestrahlung wurde also sowohl über die Expositionszeit als auch über die Ladung kontrolliert.

2.4.2.2.3 Dosimetrie

Die tatsächlich von der Probe absorbierte Dosis D in kGy ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1} = 100 \text{ rad}$) wurde aus dem LET-Wert der Elektronen in der Probe (deren Dichte mit 1 angenommen wurde) und aus der Summe der elektrischen Ladung aller das Präparat passierenden Elektronen berechnet. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß der Strahl nach Austritt aus dem evakuierten Strahlrohr eine gewisse Luftschicht und den Aluminiumprobendeckel passiert.

Für Elektronen der Energie $2,5 \text{ MeV}$ ergibt sich bei der gegebenen Anordnung aus der Tiefenverteilungskurve eine

Dosiskonstante $K = 2,5 \cdot 10^5 \text{ rad } \mu\text{Coulomb}^{-1} \text{ cm}^2$. Die Dosis D berechnet sich aus der Ladung Q mit : $D = Q \cdot K/F$, wobei F die Fläche der Probe ist.

Die Dosisberechnung wurde verifiziert durch eine Dosimetrie mittels Elektronenspinresonanz (ESR) spektroskopie. Dazu wurden Alaninkristalle in den Aluminiumgefäßen mit einer bestimmten Dosis bestrahlt. Die ESR-Spektroskopie mißt die dabei entstehenden Radikale. Die Menge dieser Radikale entspricht der absorbierten Energie und ist damit der Dosis D proportional (Regulla und Deffner, 1982).

Als zusätzliche Dosiskontrolle wurde das Prinzip der Target Size Analysis selbst ausgenützt. Dazu wurde der Aktivitätsverlust eines Moleküls bekannter Größe bestimmt, und der so berechnete Wert mit dem in der Literatur angegebenen verglichen (siehe hierzu den Ergebnisteil).

2.4.2.3 Bestimmung der biologischen Aktivität in den bestrahlten Proben

2.4.2.3.1 Opioidbindungsstudien

Nach der Bestrahlung wurden die Proben mindestens 3 Tage aufbewahrt, bevor sie auf die noch verbliebene biologische Aktivität hin untersucht wurden. Diese Maßnahme gewährleistet, daß die während der Bestrahlung entstandenen Radikale weiterreagiert haben.

Lyophilisierte Membranen wurden rehydriert, gefrorene Proben aufgetaut und rehomogenisiert. Die Gehirnschnitte wurden im 10fachen Volumen ihres Gewichts mit TRIS/HCl Puffer homogenisiert. Die Bindungsreaktion wurde, meist in Doppelt- bzw. Dreifachbestimmungen, in Polystyrolröhrchen ($\varnothing$ 1 cm; Länge 6 cm) in einem Volumen von 2 ml durchgeführt. Die Membrankonzentration lag bei Gehirngewebe bei 10 mg Gewebe/ml; bei NG 105-15 Zellen wurden ca. 5×10^5 Zellen/ml verwendet. Die Tracerkonzentration lag zwischen 0,25 und 1

nM. Dem Reaktionsgemisch in TRIS/HCl Puffer (ph 7,4; 50mM) wurden in einigen Versuchen weitere Substanzen zugesetzt (siehe Ergebnisteil). Bei [^3H]DADLE als Tracer wurden Bestatin (10^{-5} M) und Bacitracin (10 $\mu\text{g/ml}$) als Degradationshemmer hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 60-90 Minuten bei Raumtemperatur (23-25°C) hatte die Bindungsreaktion sowohl bei den unbestrahlten wie bei den bestrahlten Membranen einen Gleichgewichtszustand erreicht.

Zur Trennung des an die Membranen gebundenen radioaktiv markierten Tracers vom ungebundenen Anteil wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Bei der Zentrifugationsmethode wird das Reaktionsgemisch bei 13.000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in Szintillationsflüssigkeit suspendiert und die Menge der an das Pellet gebundenen Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. In dieser Arbeit wurde jedoch hauptsächlich die Filtrationsmethode verwendet. Hierbei wurden die Membranen bei schneller Vakuumfiltration von Glasfiberfiltern (GF/B WHATMAN) geringer Porengröße zurückgehalten. Die Filter wurden 2 x mit eiskaltem TRIS/HCl Puffer (ph 7,4; 4°C; 50mM) nachgewaschen, und die Radioaktivität auf dem Filter in Plastikgefäßen mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit in einen Beckman Beta-Zähler (LS 2800) mit einer Zählhausbeute von ca. 55% in cpm bestimmt.

Die spezifisch an den Rezeptor gebundene Menge Tracer berechnet sich aus der Gesamtbindung durch Subtraktion der unspezifisch an den Membranen oder dem Filter haftenden Menge Radioaktivität. Diese "unspezifische Bindung" wurde dadurch bestimmt, daß in einigen Probengefäßen alle Opioidrezeptoren durch Zugabe einer hohen Konzentration (je nach Ligand 10^{-6} oder 10^{-5} M) des nicht radioaktiv markierten Liganden abgesättigt wurden. Die unter dieser Bedingung am Filter oder Pellet meßbare Radioaktivität entstammt nicht vom am Rezeptor gebundenen Ligand, sondern ist an anderen Stellen, d.h. unspezifisch fixiert. Durch Bestrahlung im Dosisbereich von 0-600 kGy ändert sich die Menge der unspezifisch gebundenen Radioaktivität nicht. Daher wurde zur Berechnung der spezifischen Bindung innerhalb einer Bestrah-

lungsserie ein Mittelwert aus den für jede Dosis einzeln bestimmten unspezifischen Bindungswerten verwendet.

Die Menge des tritierten Liganden, die sich spezifisch an die Membranen bindet, hängt nicht nur von der Menge der aktiven Bindungsstellen in der Membran ab, sondern auch von der Affinität des Liganden zu diesen Bindungsstellen. Daher mußte untersucht werden, inwieweit die Abnahme des gebundenen Liganden mit steigender Bestrahlung auf eine Verminderung der Anzahl der Bindungsstellen, oder auf eine Veränderung der Affinität der Liganden zurückzuführen ist. Dazu wurden Scatchardanalysen durchgeführt; hierbei wird durch Extrapolation die zur Absättigung aller Bindungsstellen in der Membran benötigte Ligandenkonzentration bestimmt. Daraus kann dann die tatsächliche Menge an Bindungsstellen sowie die Affinität des Liganden zum Rezeptor berechnet werden. Es kann auf zwei verschiedene Arten vorgegangen werden. Entweder bestimmt man die spezifische Bindung bei verschiedenen Konzentrationen des Tracers, oder man erstellt eine vollständige Verdrängungskurve - wobei eine konstante Tracermenge mit steigenden Konzentrationen des nichtmarkierten Liganden verdrängt wird. Aus den Daten beider Versuchsanordnungen kann ein Diagramm erstellt werden, bei dem auf der Ordinate die Menge des gebundenen Liganden, dividiert durch die Menge des im Reaktionsmedium ungebunden vorliegenden Liganden (gebunden/frei) als Funktion der Menge des ungebundenen Liganden (frei, auf der Abszisse aufgetragen) dargestellt wird. In diesem sogenannten "Scatchard Plot" entspricht die Steigung der Geraden der Affinität des Liganden zum Rezeptor; der Schnittpunkt mit der x-Achse gibt den $B_{\max}$ -Wert an, d.h. die maximal markierbare Menge an Bindungsstellen und damit die Anzahl der Rezeptoren in der Membran (Scatchard, 1949).

Werden mehrere Rezeptoren vom selben Liganden mit unterschiedlicher Affinität erkannt, so ergibt sich im Scatchard Plot nicht eine Gerade, sondern eine Kurve. Solche Kurven können in ihre linearen Komponenten zerlegt werden, aus denen die Anzahl und Affinität der einzelnen Rezeptoren

zu diesem Liganden bestimmt werden können.

2.4.2.3.2 Flunitrazepam-Bindungsstudie

Die Bestimmung der Flunitrazepambindung (Squires und Braestrup, 1977) wurde analog zur Opioidbindungsstudie in TRIS/HCl durchgeführt, allerdings wurde eine Inkubationstemperatur von 4°C statt 25°C gewählt. Dies ist angezeigt, da sich bei Raumtemperatur die unspezifische Bindung durch Degradation des Flunitrazepams erhöht. Diese wurde üblicherweise durch Zusatz von 10^{-6} M unmarkiertem Flunitrazepam, in einigen Versuchen auch 10^{-6} M Diazepam, bestimmt.

2.4.2.3.3 Acetylcholinesterase Aktivitätsbestimmung

Von den für in Bindungsstudien eingesetzten bestrahlten Membransuspensionen wurde ein Teil zur Dosisbestimmung mittels des Acetylcholinesterase-Tests aufbewahrt. Hierzu wurde diese Suspension (10 mg Gewebe/ml) mit 0,5% Triton X 100 versetzt, ca. 15 Minuten auf Eis stehen gelassen und abzentrifugiert (15 Minuten, 40.000 x g). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit aqua purificata auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml gebracht. Die Aktivitätsbestimmung wurde nach der Methode von Sterri und Fonnum (1978) - modifiziert nach Lucas und Kreutzberg (1985) - durchgeführt. Dazu wurden 70 µl des Extrakts in einem Reaktionsvolumen von 80 µl bei 37°C mit [14 C]Acetylcholin als Substrat (10^{-4} M, 5 µl) in Anwesenheit von 10^{-4} M Ethopropazine und 10^{-4} M Tetraäisopropylpyrophosphoramid (beides Butyrylcholinesteraseinhibitoren) inkubiert. Die Reaktion wurde nach 40 Minuten durch Zugabe von 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) beendet, und das Reaktionsgemisch in ein Zählgläschen mit 5 ml eines lipophilen Szintillators gegeben (Instafluor mit N-Octylaminphosphat). Das durch die enzymatische Aktivität der Probe gebildete [14 C]Acetat gelangt durch das organische Phosphat des Szintillators in die lipophile Phase, und kann daher ohne vorherige Trennung unabhängig vom (nicht hydrolysierten) [14 C]Acetylcholin in einem Beta-Zähler

bestimmt werden. Ähnlich wie bei den Bindungsstudien wurde auch hier ein Leerwert (entspricht Hydrolyse ohne Enzym) bestimmt und von der Gesamtaktivität abgezogen.

2.4.3 Analyse der experimentellen Daten

Mit Hilfe von Bindungsstudien wurde für jede Probe die nach Bestrahlung noch verbleibende Opioidbindungsaktivität bestimmt. Innerhalb der Bestrahlungsserie wurde diese Aktivität A als Prozentwert der Aktivität der unbestrahlten Kontrollproben (A_0) ausgedrückt. Wird dieser Wert (A/A_0) auf der Ordinate halblogarithmisch als Funktion der jeweiligen Bestrahlungsdosis (Abszisse) aufgetragen, so erhält man die sog. Inaktivierungskurve. In dieser Studie wurden sowohl multiexponentielle als auch monoexponentielle Inaktivierungskurven erhalten. Daher wurde jede Kurve einer Computeranalyse unterworfen, bei der nacheinander eine monoexponentielle und eine biexponentielle Funktion an die Meßdaten angepaßt wurde. Die dabei verwendeten Formeln lauten:

$$A/A_0 = C \cdot \exp^{-s \cdot D}$$

$$\text{und } A/A_0 = C_1 \exp^{-s_1 D} + C_2 \exp^{-s_2 D}$$

Hierbei ist A_0 die Aktivität der unbestrahlten Probe, A die verbleibende Aktivität nach der Dosis D ; C_1 und C_2 entsprechen den relativen Mengen der beiden Komponenten. s_1 und s_2 stellen die Steigungen der einzelnen Komponenten dar.

Die Anpassung erfolgte nach der Methode der "kleinsten quadratischen Abweichungen", und auf der Basis eines RUN-Tests und des Vergleichs der mittleren quadratischen Abweichungen mit Hilfe eines F-Tests wurde entschieden, ob das Modell einer Zweikomponentenkurve die Meßdaten signifikant besser beschreibt, als das Einkomponentenmodell. Das Computerprogramm wurde von Herrn Konradin Rauh erstellt.

Für einige Versuche mußte entschieden werden, ob sich

mehrere Inaktivierungskurven signifikant voneinander unterscheiden, und in welchen Parametern, s oder C , dies der Fall ist. Hierzu wurde ein für kinetische Studien entwickeltes Programm "EXPFIT" (Broccardo et al., 1984) verwendet. Mit diesem Programm können bei einem vorgewählten Modell (1 oder 2 oder mehrere exponentielle Komponenten) die Parameter (C und s) gleichzeitig für mehrere Inaktivierungskurven gefunden werden. Dabei kann festgesetzt werden, welche Parameter (C oder s) das Programm für alle Kurven frei wählen darf, und welche davon für einige Kurven gleichgesetzt werden sollen. Ein F-Test vergleicht verschiedene auf diese Art gewonnene Anpassungen. So kann entschieden werden, welche Parameter sich innerhalb einer Gruppe von Inaktivierungskurven signifikant unterscheiden, und für welche Kurven man die Steigungen bzw. das Verhältnis der einzelnen Komponenten gleichsetzen kann, ohne daß sich dadurch die Beschreibung der Meßdaten durch die Funktion signifikant verschlechtert.

Zur Bestimmung der Ligandenaffinität bei verschiedenen bestrahlten Geweben wurden Sättigungskurven erhoben und nach der Methode von Scatchard (1949) ausgewertet. Alternativ wurden Verdrängungskurven verwendet und mit dem von Munson und Rodbard entwickelten Programm LIGAND (Munson und Rodbard, 1980) analysiert. Ähnlich wie bei den beiden zuvor beschriebenen Programmen, werden dabei die Parameter (hier Affinität K_D und Menge der Rezeptoren B_{max}) ermittelt, mit denen ein vorgegebenes Modell (eine oder mehrere Rezeptorpopulationen) einen Graph ergibt, mit dem die Meßdaten am besten übereinstimmen. Auch hier wird mit Hilfe von statistischen Tests die Güte und Signifikanz von verschiedenen Anpassungen untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

Einfluß der Gefriertrocknung auf die Opioidbindung:

Wie in Absatz 2.2.1 dargestellt, können zur Bestrahlung nur Proben, die entweder getrocknet oder gefroren sind, verwendet werden. Da die Bestrahlung von getrockneten Proben bei Raumtemperatur apparativ weniger aufwendig ist, wurde zunächst dieser Methode der Vorzug gegeben. Dazu mußte untersucht werden, ob die Membranen ohne wesentliche Veränderung der Opioidbindungsfähigkeit lyophilisiert werden können. In Tabelle I wird gezeigt, daß sich die Menge des an Membranen von Rattenhirnen gebundenen Liganden durch Gefriertrocknung nicht verändert.

Gewebe	Tracer [0.25nM]	Anzahl der Versuche	spezifische Bindung Mittelwert $\pm$ SEM (fmol/mg protein)		Verhältnis lyo./gefr.
			lyo.	gefroren	
Ratten- gehirn	[³ H]OXY	4	39 $\pm$ 3	38 $\pm$ 2	1.04
	[³ H]DIPR	4	158 $\pm$ 41	163 $\pm$ 50	0.97
NG 108- 15 Zel- len	[³ H]DADLE	4	69 $\pm$ 1	198 $\pm$ 11	0.35
	[³ H]DIPR	2	172 $\pm$ 4	448 $\pm$ 5	0.38

Tabelle I: Spezifische Opioidbindung in gefrorenen und gefriergetrockneten Membranen von Rattengehirnen bzw. NG 108-15 Zellen.

Zusätzlich wurde mittels Scatchardanalysen die Bindung des Opioidagonisten [^3H]Oxymorphon an gefriergetrockneten Membranen im Vergleich zu gefrorenen Membranen genauer untersucht. In gefriergetrockneten Membranen wurde die Affinität zu dem Opioidagonisten [^3H]Oxymorphon mit $1,6 \pm 0,5 \text{ nM}$ gemessen und die Menge an Rezeptoren mit $8,6 \pm 1 \text{ pmol/g}$ Feuchtgewebe bestimmt. Diese Werte entsprechen den in gefrorenen Membranen gemessenen: $K_D = 1,3 \pm 0,1 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 8 \pm 0,9 \text{ pmol/g}$ Feuchtgewebe.

Auch die Effekte von Na^+ und von Guanosinnukleotiden wurden durch das Lyophilisieren kaum beeinflusst. 100 mM NaCl inhibierten die Bindung des Opioidagonisten [^3H]Oxymorphon um $37 \pm 4\%$ in gefrorenen und um $29 \pm 6\%$ in gefriergetrockneten Membranen. Das stabile GTP-Analogon GMP-PNP, in einer Konzentration von 10^{-6} M , reduzierte in gefrorenen Membranen die Bindung dieses Tracers um $59,1 \pm 5\%$ und um $67,2 \pm 6\%$ in gefriergetrockneten Membranen. Auch das Verhältnis der verschiedenen Opioidrezeptortypen wurde durch Lyophilisieren nicht verändert. Durch sequentielle Verdrängung des unspezifischen Liganden [^3H]Diprenorphin (Magan et al., 1982) ergab sich ($n=3$), daß in lyophilisierten Membranen von Rattengehirnen $61 \pm 2,6\%$ des gebundenen [^3H]Diprenorphin am μ -Typ, $16 \pm 1,8\%$ am δ -Typ und $23 \pm 2,6\%$ am κ -Typ vorlagen. An gefrorenen Membranen wurden folgende Werte erhalten: μ : $60 \pm 1,8\%$; δ : $20 \pm 2,6\%$; κ : $20 \pm 0,8\%$.

Somit wird durch die Gefrieretrocknung von Rattengehirnmembranen weder die Affinität zu den Opioiden, noch die Menge an Rezeptoren oder deren Empfindlichkeit gegenüber allosterischen Modulatoren wesentlich verändert.

Bei Membranen von NG 108-15 Zellen hingegen führt die Gefrieretrocknung zu einem 60-70%igen Verlust der Opioidbindung (siehe Tabelle I). Dieser Bindungsverlust ist allerdings nicht spezifisch für den Opioidrezeptor. Die Bindung des Muscarinrezeptorliganden [^3H]QNB (= L-Quinuclidinylbenzylat) und des α -adrenergen Liganden [^3H]Yohimbin werden

ebenfalls durch die Gefriertrocknung um je ca. 70% reduziert. Es handelt sich hier also nicht um eine besondere Labilität des δ -Opioidrezeptors, sondern vielmehr um eine allgemeine Instabilität der Membranproteine von NG 108-15 Zellen gegenüber Gefriertrocknung.

Im folgenden wird dargestellt, wie die Opioidrezeptorbindung durch Bestrahlung reduziert wird. Allgemein gilt, daß die spezifische Bindung der Opioide an die Membranen mit steigender Dosis abnimmt, während die unspezifisch gebundene Menge radioaktiver Substanz über den untersuchten Dosisbereich konstant bleibt.

Es wurden drei verschiedene Membranpräparationen untersucht. Dabei wurde im Prinzip die gleiche Bestrahlungsmethodik angewandt, nur die Vorbereitungsart des Untersuchungsgebietes wurde variiert.

3.2 Strahleninaktivierung der Opioidbindung in lyophilisierten Membranen:

Abb. 5 zeigt die Reduktion der spezifischen [^3H] Oxy-morphonbindung an Rattengehirnmembranen durch Bestrahlung. Wie im Methodenteil beschrieben, kann diese mehr-exponentielle Inaktivierungskurve in zwei monoexponentielle Komponenten, eine mit steilerer ($178 \pm 13 \text{ MGy}^{-1}$) und eine mit flacherer ($14,1 \pm 2,2 \text{ MGy}^{-1}$) Steigung, zerlegt werden. Dabei macht die steilere Komponente mehr als 85% der Gesamtbindungsaktivität aus.

Um zu prüfen, ob sich die Affinität der Liganden durch Bestrahlung verändert, wurden für unterschiedlich stark bestrahlte Proben Scatchardanalysen durchgeführt. Der Vergleich ergab keine Veränderung der Affinität, so daß die Verminderung der spezifischen Bindung nur auf eine Reduktion der Menge der Rezeptoren zurückzuführen ist. Allerdings ist bei höherer Dosis, also im Bereich der flacheren Komponente, die spezifische Opioidbindung sehr klein (ca. 10% der Ausgangsmenge), so daß Scatchardanalysen, wegen des kleinen

Unterschieds zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung, mit großen Fehlern behaftet sind; in diesem Bereich konnte die Affinität daher nicht mehr genau bestimmt werden.

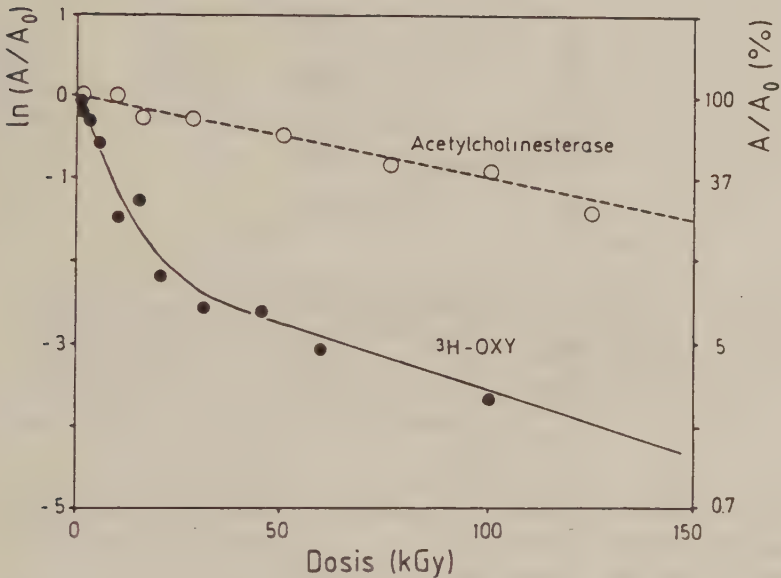


Abb. 5: Inaktivierungskurve der [^3H]Oxymorphonbindung in Membranen, die lyophilisiert bei 25°C bestrahlt waren:

Auf der Ordinate (rechte Seite) ist die Menge der spezifischen [^3H]Opioidbindung A als % der Ausgangsbindung A_0 in unbestrahlten Membranen aufgetragen bzw. (linke Seite) der natürliche Logarithmus des Quotienten A/A_0 . Auf der Abszisse ist die Bestrahlungsdosis in kGy angegeben.

Die Daten der [^3H]Oxymorphonbindung (●) stellen Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen dar. Die Parameter der biexponentiellen Funktion sind in Tabelle II angegeben. Zum Vergleich ist die Inaktivierungskurve der Acetylcholinesterase (○) in denselben Membranen (n=4) eingezeichnet. Die Steigung dieser monoexponentiellen Funktion $s=9.7 \pm 0.46 \text{ kGy}^{-1}$ entspricht einer molekularen Größe von $62 \pm 3 \text{ kDa}$.

Neben dem Agonisten [^3H]Oxymorphon wurden auch noch andere Liganden (siehe Tabelle II) untersucht. Unabhängig von den agonistischen oder antagonistischen Eigenschaften dieser Liganden und unabhängig von der Rezeptorselektivität ergibt sich jeweils eine mehr exponentielle Inaktivierungskurve (Abb. 6).

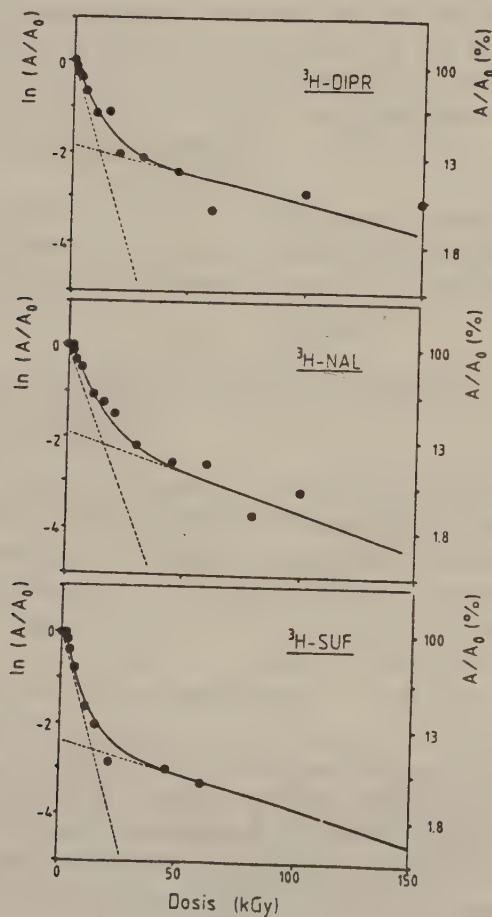


Abb. 6: Analog zu Abb. 5 sind die Inaktivierungskurven für die Bindung weiterer [^3H]Opioidliganden abgebildet. Die Kurven wurden mit Hilfe des Computerprogramms EXPFIT in ihre beiden exponentiellen Komponenten zerlegt. Diese sind als unterbrochene Linien miteingezeichnet.

In Tabelle II sind für verschiedene Liganden die Steigungen der beiden Komponenten sowie ihre relativen Anteile an der Gesamtbindung dargestellt.

Tracer	Anzahl der Versuche	s_1	(MGy^{-1})	s_2	C_1	(%)	C_2
[^3H]NAL	8	129 $\pm$ 21	17 $\pm$ 0,5	88,7 $\pm$ 5	14,6 $\pm$ 4,3		
[^3H]OXY	6	178 $\pm$ 13	14,1 $\pm$ 2,2	84,5 $\pm$ 5,2	14,2 $\pm$ 4,7		
[^3H]DIPR	6	154 $\pm$ 15	13,4 $\pm$ 2,2	84,1 $\pm$ 5,5	17,1 $\pm$ 2,2		
[^3H]DADLE	2	65 $\pm$ 21	15,4 $\pm$ 1,3	81,3 $\pm$ 18,4	17,4 $\pm$ 12,7		
[^3H]SUF	2	180 $\pm$ 19	14,1 $\pm$ 10	91 $\pm$ 4	9,3 $\pm$ 2,4		

Tabelle II: Rattengehirnmembranen wurden lyophilisiert und bei 25°C bestrahlt. Nach dem Rehydrieren wurde die Opioidbindungs-fähigkeit mit mehreren Liganden getestet. Die Computeranalyse der Inaktivierungskurven ergab in allen Fällen eine biexponentielle Funktion. Die berechneten Parameter-Steigungen s_1 und s_2 , sowie die relativen Anteile der beiden Komponenten C_1 und C_2 sind angegeben.

Wird die Bindung verschiedener Liganden an dieselben Membranen untersucht, so ist kein Unterschied in den Inaktivierungskurven zu erkennen. Hingegen können größere Schwankungen im Verhältnis der beiden Komponenten beobachtet werden, wenn in verschiedenen Arbeitsgängen lyophilisierte Membranserien miteinander verglichen werden. In einigen lyophilisierten Serien war die steilere Komponente so stark ausgeprägt, daß eine zweite flachere Komponente nicht mehr zu bestimmen war.

Wie Vorversuche zeigten, wird durch Lyophilisieren der NG 108-15 Membranen die Opioidbindungs-fähigkeit dieser Membranen stark herabgesetzt (siehe Tabelle I). Bestrahlung führt zu einer weiteren dosisabhängigen Reduktion der Bindung, wobei die Inaktivierungskurve einen mehr-exponentiellen Verlauf nimmt. Damit entspricht dieses Ergebnis qualitativ den in lyophilisierten Rattengehirnen erhaltenen Inaktivie-

rungskurven. Da die spezifische Bindung unter diesen Bedingungen allerdings sehr gering ist, wurde auf eine weitere Untersuchung von lyophilisierten Tumorzellmembranen verzichtet.

3.3 Strahleninaktivierung in gefrorenen Membransuspensionen

Abbildung 7 zeigt die Strahleninaktivierung der [^3H] Oxymorphonbindung in Membranen, die als gefrorene Suspension bei -70°C bestrahlt wurden. Auch hier folgt die Abnahme der Opioidbindungsfähigkeit einem mehr-exponentiellen Verlauf. Die Inaktivierungskurve kann, analog zu der in Abb. 6 darge-

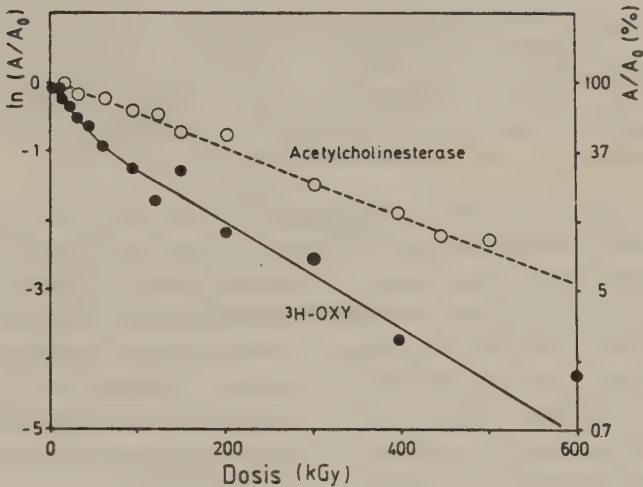


Abbildung 7: Rattengehirnmembranen wurden in einer Suspension von 100 mg Feuchtgewebe/ml bei -70°C bestrahlt und die [^3H]Oxymorphonbindung an diese Membranen gemessen. Die Daten ($\bullet$) sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Versuchen. Die Parameter (s und C) der biexponentiellen Funktion sind in Tabelle III angegeben. Als Vergleich ist der Aktivitätsverlust der Acetylcholinesterase ($\circ$) in denselben Membranpräparationen ($n=4$) bestimmt. Die Steigung dieser monoexponentiellen Kurve beträgt $4,7 (+0,23) \text{ MGy}^{-1}$; dies entspricht einem Molekulargewicht von $60 \pm 3 \text{ kDa}$.

stellten Kurve, in eine steilere ($66 \pm 4 \text{ MGy}^{-1}$) und eine flachere ($8,9 \pm 0,2 \text{ MGy}^{-1}$) Komponente aufgeteilt werden. Im Vergleich zu lyophilisiert bestrahlten Membranen hat hier der Anteil der flacheren Komponente zugenommen, und macht über 30% der Gesamtbindungsaktivität aus.

Mittels Scatchardanalyse wurde wiederum untersucht, inwieweit die Bestrahlung eine Veränderung der Rezeptoraffinität des Liganden bewirke. Abb. 8 zeigt, daß dies nicht der Fall ist.

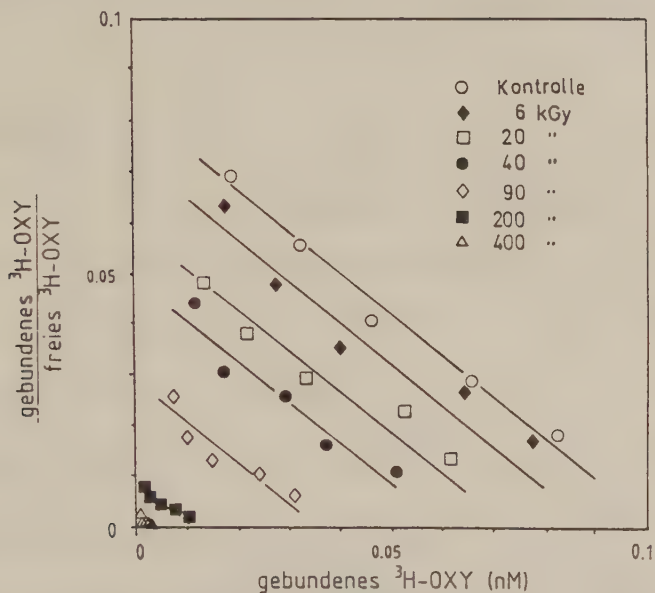


Abbildung 8: Bei gefrorenen Gehirnmembranen, die bei -70°C bestrahlt wurden, wurde die [^3H]Oxymorphonbindung mit 5 verschiedenen Tracerkonzentrationen ($0,24 - 4 \text{ nM}$) bestimmt. Die Membrankonzentration im Bindungsassay betrug $10 \text{ mg Feuchtgewebe/ml}$. Auf der Ordinate ist der Quotient aus der Menge des gebunden und frei vorliegenden Tracers B/F, auf der Abszisse der gebunden vorliegende Tracer B aufgetragen. In dieser Darstellung (Scatchard Plot) entspricht die Steigung der Kurven der Ligand-Rezeptor-Affinität ($K_D = 1,28 \text{ nM}$), der X-Achsen-Abschnitt entspricht der Menge der vorhandenen Rezeptoren (B_{max}). Die Daten entsprechen einem repräsentativen Experiment, das in dreifacher Bestimmung durchgeführt wurde und mit gleichem Ergebnis zweimal wiederholt wurde.

Die Verminderung der Bindung ist einzig auf eine Reduktion der Menge an Rezeptoren zurückzuführen. Die Affinität, hier auch bei höherer Bestrahlung im Bereich der flacheren Komponente (ab etwa 90 kGy) noch gut meßbar, zeigt keine dosisabhängige Veränderung.

Analog zu den lyophilisierten Membranen wurde auch bei den gefrorenen Membransuspensionen kein deutlicher Unterschied in der Strahleninaktivierung gefunden, wenn verschiedene Opioidliganden verwendet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Tracer	Anzahl der Versuche	s_1 (MGy ⁻¹)	s_2	C_1	C_2 (%)
[³ H]NAL	4	126 $\pm$ 75	7 $\pm$ 1,6	37 $\pm$ 4	61 $\pm$ 5
[³ H]OXY	5	66 $\pm$ 4	8,9 $\pm$ 0,2	32 $\pm$ 10	64 $\pm$ 6
[³ H]DIPR	6	149 $\pm$ 13	6,5 $\pm$ 1,9	15 $\pm$ 12	82 $\pm$ 8

Tabelle III: Rattengehirnmembranen wurden bei -70°C bestrahlt und nach dem Auftauen mit verschiedenen Liganden die Opioidbindungsfähigkeit gemessen. Analog zu Tabelle II sind die Steigungen (s_1 und s_2) sowie die relativen Anteile (C_1 und C_2) der beiden Komponenten der biphasischen Inaktivierungskurve dargestellt.

Außer Rattengehirnmembranen wurden auch bestrahlte Membranen der Hybridzellen NG 108-15 untersucht, die nur den δ -Typ des Opioidrezeptors enthalten. Es wurde sowohl die Bindung des δ -Agonisten [³H]DADLE als auch des partiellen Agonisten [³H]Diprenorphin untersucht. Scatchardanalysen zeigten keine Veränderung der Affinitäten, aber eine Abnahme der Rezeptormenge mit steigender Bestrahlungsdosis.

Abbildung 9 zeigt, daß die Inaktivierungskurven für beide untersuchten Liganden zweiphasisch verlaufen. Damit entsprechen diese Ergebnisse in Tumorzellen denen in Rattengehirnmembranen.

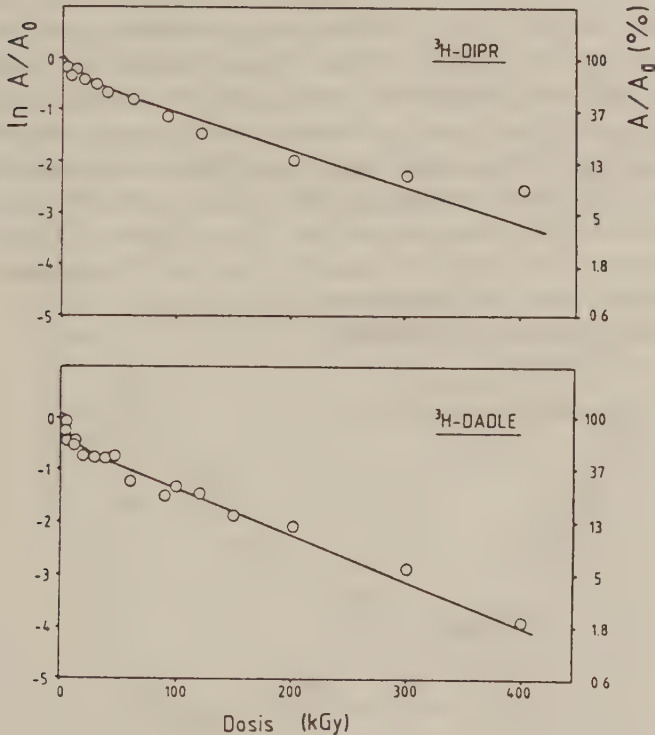


Abbildung 9: NG 108-15 Hybridzellen wurden als Homogenat von ca. 10^6 Zellen (d.h. 2,5 -3 mg Protein)/ml in TRIS Puffer (50 mM) bestrahlt, und nach dem Auftauen wurde mit $[^3\text{H}]$ Diprenorphin bzw. $[^3\text{H}]$ DADLE die Abnahme der Opioidbindung gemessen. Die Daten stellen Mittelwerte aus je 3 Versuchen dar. Die Parameter der beiden biexponentiellen Inaktivierungskurven sind:

$$\begin{aligned}
 [^3\text{H}]\text{DIPR:} \quad & C_1 = 34,3 \pm 11; \quad C_2 = 67,8 \pm 8\% \\
 & s_1 = 52,4 \pm 16; \quad s_2 = 7,0 \pm 0,9 \text{ MGy}^{-1} \\
 [^3\text{H}]\text{DADLE:} \quad & C_1 = 39 \pm 3,5; \quad C_2 = 60 \pm 3\% \\
 & s_1 = 220 \pm 95; \quad s_2 = 8,7 \pm 0,8 \text{ MGy}^{-1}
 \end{aligned}$$

3.4. Versuche zur Klärung des Unterschieds zwischen den Inaktivierungskurven bei Bestrahlung gefrorener bzw. gefriergetrockneter Membransuspensionen

3.4.1. Bestrahlung lyophilisierter Membranen bei -70°C

Um zu klären, ob die Unterschiede zwischen den Inaktivierungskurven bei gefroren oder lyophilisiert bestrahlten Membranen auf den Temperaturunterschied während der Bestrahlung zurückzuführen ist, wurden lyophilisierte Membranen analog zu den Bedingungen der Bestrahlung von gefrorenen Membranen bei einer Temperatur von -70°C bestrahlt. In Abb. 10 ist die Inaktivierungskurve für den Liganden $[^3\text{H}]\text{Oxymorphon}$ gezeigt. Wie bei der Bestrahlung bei Raumtemperatur zeigt diese einen Zweikomponentenverlauf, wobei die steilere der beiden Komponenten überwiegt.

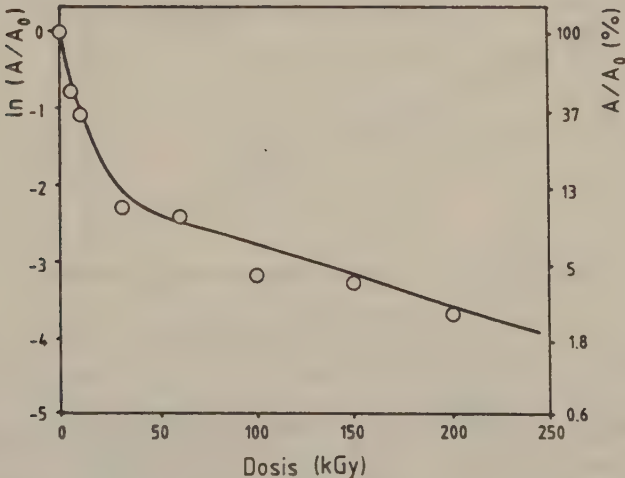


Abbildung 10: Rattengehirnmembranen wurden lyophilisiert und bei -70°C bestrahlt. Die Inaktivierung der Opioidbindungsfähigkeit wurde mit $[^3\text{H}]\text{Oxymorphon}$ ($0,48 \text{ nM}$) untersucht. Es wurde eine biexponentielle Inaktivierungskurve mit den Parametern

$$C_1 = 86,4 \pm 7,4; C_2 = 13,4 \pm 7,9\%$$

$$s_1 = 133 \pm 37; s_2 = 8,1 \pm 5,2 \text{ MGy}^{-1}$$

erhalten. Die Daten sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen.

Auch für den Liganden [^3H]Diprenorphin verläuft die Inaktivierungskurve bei lyophilisierten Membranen, die bei -70°C bestrahlt sind, ähnlich (nicht abgebildet).

3.4.2. Bestrahlung von lyophilisierten Proben unter Ausschluß von Luft

Zur Klärung der Frage, ob etwa der in der Probe vorhandene atmosphärische Sauerstoff, oder der durch Bestrahlung ebenfalls aktivierbare Stickstoff die Ursache für die Krümmung der erhaltenen Inaktivierungskurven darstellt, wurden

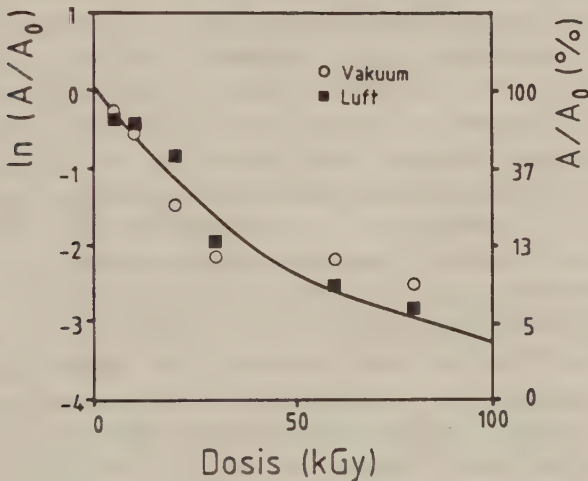


Abbildung 11: Lyophilisierte Rattengehirnmembranen wurden bei Raumtemperatur in Luft oder in Vakuum₃ bestrahlt. Nach dem Rehydrieren wurde die Bindung des [^3H]DADLE an diese Membranen gemessen. Die Inaktivierungskurven der beiden Bestrahlungsarten waren nicht signifikant unterschiedlich. Die Menge der flachen Komponenten betrug $20 \pm 13\%$, deren Steigung $s_2 = 14,5 \pm 5 \text{ MGy}^{-1}$; die Steigung der steilen Komponente beträgt $s_1 = 58 \pm 18 \text{ MGy}^{-1}$ ($C_1 = 82 \pm 13\%$). Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch. Dasselbe Ergebnis wurde mit anderen Liganden in unabhängig bestrahlten Membranserien wiederholt.

Bestrahlungen im Vakuum, oder auch nach Austausch der Luft innerhalb der lyophilisierten Probe mit dem strahleninerten Gas Helium vorgenommen. In beiden Fällen konnte kein Unterschied in der Inaktivierung des Rezeptors im Vergleich zu in Luft bestrahlten Proben beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde mit mehreren Opioidliganden ($[^3\text{H}]\text{OXY}$; $[^3\text{H}]\text{DADLE}$; $[^3\text{H}]\text{NAL}$; $[^3\text{H}]\text{LOF}$; $[^3\text{H}]\text{DIPR}$) erhalten. Abbildung 11 zeigt als Beispiel die $[^3\text{H}]\text{DADLE}$ -Bindung in Membranen, die lyophilisiert in Luft bzw. im Vakuum bestrahlt wurden.

3.4.3 Bestrahlung lyophilisierter und danach rehydrierter Membranen bei -70°C

Eine Rattenmembransuspension wurde wie üblich als Proben von je 5ml in Bestrahlungsgefäßen bei -70°C gefroren. Ein Teil dieser Proben wurde aufbewahrt, der Rest über Nacht lyophilisiert. Ein Teil dieser lyophilisierten Proben wurde mit der Ausgangsmenge Wasser (5ml) wieder aufgefüllt, und sofort ohne Quellenlassen oder Homogenisieren auf Trockeneis gefroren. Diese drei verschiedenen Serien ("gefroren", "lyophilisiert", "rehydriert") wurden jeweils bei -70°C bestrahlt. Der Vergleich der Inaktivierungskurven ergab, daß durch die Bestrahlung der lyophilisierten Probe in Wasser die steile Komponente im Vergleich zur Bestrahlung der lyophilisierten Probe in Luft reduziert ist. Die rehydrierten Proben entsprechen in etwa den ohne vorhergehende Lyophilisierung gefroren bestrahlten Proben. Abbildung 12 zeigt einen exemplarischen Versuch, der mit gleichem Ergebnis zwei weitere Male wiederholt wurde.

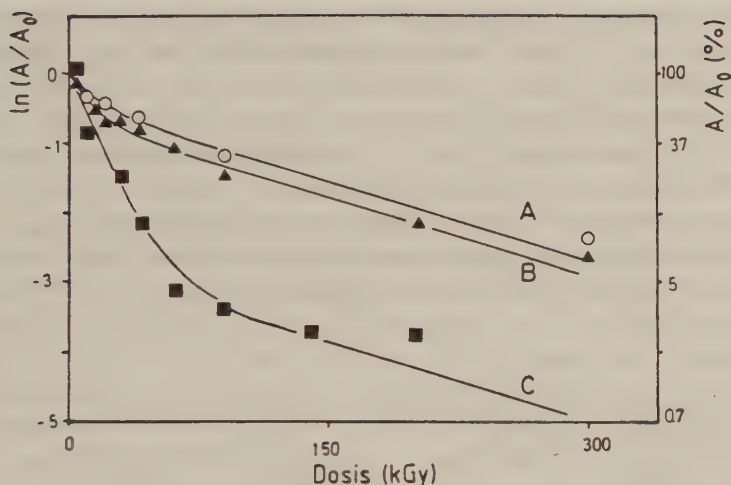


Abbildung 12: Es wurden drei verschiedene Membranpräparationen bei -70°C bestrahlt:

- A gefrorenes Gehirnhomogenat (-70°C)
- B lyophilisiertes Gehirnhomogenat, das vor der Bestrahlung mit destilliertem Wasser wieder aufgefüllt und bei -70°C gefroren wurde.
- C lyophilisierte Membranen

Nach der Bestrahlung wurde mittels Scatchardanalysen der $[^3\text{H}]$ Oxymorphonbindung in jeder Probe die Menge an Rezeptoren bestimmt. Die Analyse der jeweils biexponentiellen Inaktivierungskurven zeigte, daß sich die Steigungen der beiden Komponenten für die drei Präparationen nicht signifikant unterscheiden [$p=0,9$]

$$s_1 = 55 \pm 13 \text{ MGy}^{-1} \text{ und}$$

$$s_2 = 6,3 \pm 0,23 \text{ MGy}^{-1}.$$

Bei den jeweiligen Anteilen der Komponenten erwies sich der Unterschied zwischen A und B als nicht signifikant [$p=0,3$], während bei C ein signifikant größerer Anteil [$p<0,001$] der steilen Komponente gemessen wird.

$$\begin{array}{ll} \text{A} & C_1 = 39 \pm 16; \quad C_2 = 60 \pm 13 \\ \text{B} & C_1 = 56 \pm 15; \quad C_2 = 44 \pm 11 \\ \text{C} & C_1 = 103 \pm 10; \quad C_2 = 6,3 \pm 9,3 \end{array}$$

3.4.4. Zusatz von Antioxidantien

Zu den Rattengehirnsuspensionen wurden verschiedene Antioxidantien zugesetzt: DTT in einer Konzentration von 10 mM, Cystein (10 mM) oder α -Tocopherol (5,3 mg in Aethanol/g Feuchtgewebe). Weder bei lyophilisierten noch bei gefrorenen Membranen bewirkte die Anwesenheit einer dieser Schutzstoffe bzw. die Kombination (Abb. 13) während der Bestrahlung eine Veränderung der Strahleninaktivierung. Abb. 13 zeigt die Inaktivierungskurve der [^3H]Oxymorphonbindung bei lyophilisierten Membranen, denen sowohl das lipophile α -Tocopherol als auch das hydrophile DTT zugesetzt wurde.

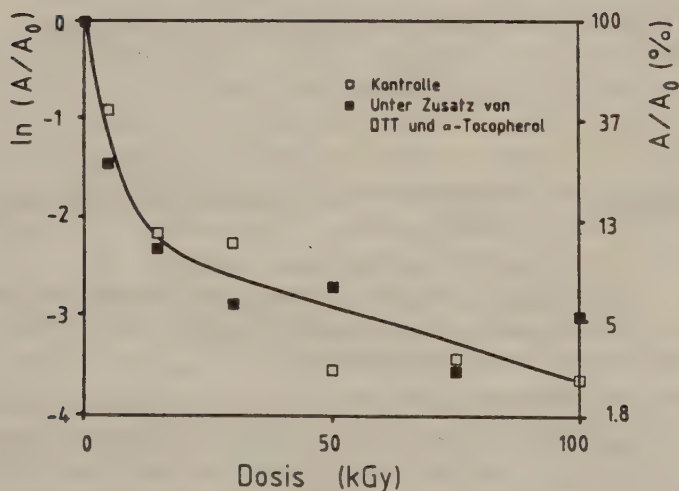


Abbildung 13: Rattengehirnmembranen wurden unter Zusatz von (■) bzw. ohne (□) Antioxidantien (Dithiotreitol 10 mM und α -Tocopherol 10 mg/g Feuchtgewebe) lyophilisiert und bei -70°C bestrahlt. Die beiden Inaktivierungskurven der [^3H]Oxymorphonbindung sind nicht signifikant unterschiedlich [$p=0,17$]. Die berechneten Parameter der Kurve sind: $C_1 = 88,2 \pm 5,7\%$, $s_{1-1} = 144,5 \pm 21 \text{ MGy}^{-1}$; $C_2 = 11,8 \pm 4,9\%$ und $s_2 = 7,4 \pm 4,9 \text{ MGy}^{-1}$.

Um die Bestrahlung der Substanz DTT zu verhindern, aber dennoch eventuell gebildete Radikale damit abzufangen, wurden lyophilisiert bestrahlte Proben mit einem Puffer rehydriert, dem DTT (10 mM) zugesetzt war. Auch diese Maßnahme beeinflusste weder die Steilheit noch das Ausmaß der beiden Komponenten der Inaktivierungskurven.

3.4.5 Verdünnungsversuche

Membransuspensionen verschiedener Konzentrationen (von 10-200 mg Gewebe/ml) wurden gefroren bei -70°C bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben auf eine einheitliche Konzentration von 10 mg/ml gebracht, und die verbleibende Opioidbindung mit dem Liganden [^3H]Diprenorphin gemessen. Abbildung 14 zeigt, daß sich das Verhältnis der beiden Komponenten deutlich konzentrationsabhängig verändert. Mit steigender Membrankonzentration nimmt der Anteil der steileren Komponente an der Gesamtbindung ab. Dabei bleibt die Steigung der flacheren Komponente unverändert, während die Steigung der steileren Komponente stärkeren Schwankungen unterliegt.

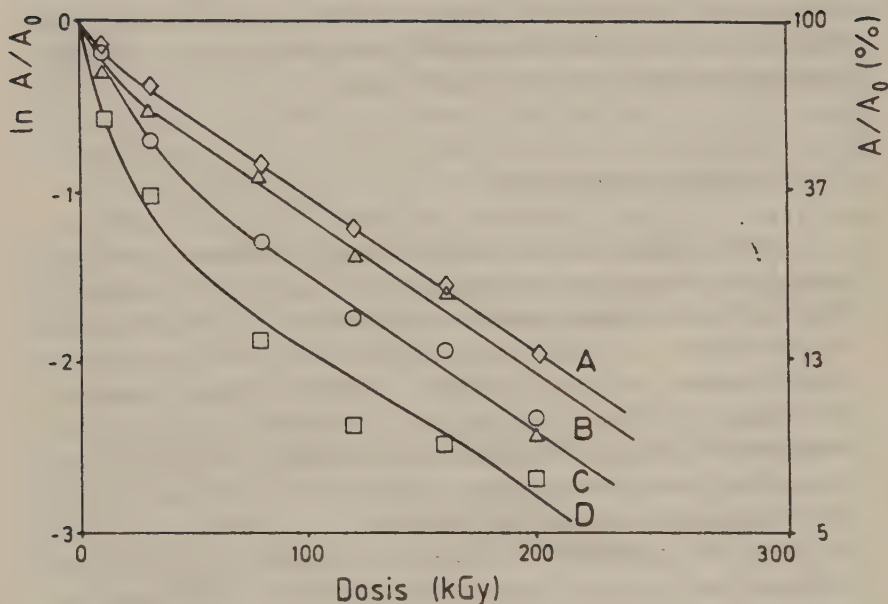


Abbildung 14: Rattengehirnmembranen wurden in verschiedenen Verdünnungen bestrahlt: A ($\diamond$) 200 mg Feuchtgewebe/ml, B (Δ) 100 mg/ml, C ($\circ$) 20 mg/ml und D ($\square$) 10 mg/ml. Die 4 Inaktivierungskurven der [3 H]Diprenorphinbindung wurden mit Hilfe des Computerprogramms in ihre beiden Komponenten zerlegt. Die Steigungen jeweils der flachen Komponente erwiesen sich als nicht signifikant unterschiedlich ($s_2 = 8,9 \pm 0,4$ MGy $^{-1}$). Hingegen unterscheiden sich sowohl die Steigungen der steilen Komponenten s_1 , als auch die relativen Anteile der Komponenten signifikant voneinander [$p \leq 0,002$]. Die berechneten Werte dieser Parameter sind:

- A) $s_1 = 31 \pm 5,5$ MGy $^{-1}$; $C_1 = 13,5 \pm 3,8\%$; $C_2 = 86 \pm 3,1\%$
 B) $s_1 = 32 \pm 3,8$ MGy $^{-1}$; $C_1 = 22,7 \pm 3,7\%$; $C_2 = 77,3 \pm 3,1\%$
 C) $s_1 = 57 \pm 1$ MGy $^{-1}$; $C_1 = 45,9 \pm 4,5\%$; $C_2 = 54,4 \pm 4,3\%$
 D) $s_1 = 95 \pm 1$ MGy $^{-1}$; $C_1 = 62,8 \pm 3,8\%$; $C_2 = 36,6 \pm 3,2\%$

Die abgebildeten Daten sind aus einem Experiment. Das Ergebnis wurde in einem 2. unabhängigen Versuch bestätigt.

3.5. Bestrahlung von "intaktem" Gewebe

3.5.1. Rattengehirnschnitte

Als dritte Probenpräparation wurde Gewebe in möglichst intaktem Zustand bestrahlt. Dazu wurden dünne Gehirnschnitte bei -70°C gefroren und erst nach der Bestrahlung homogenisiert. Im Gegensatz zu beiden vorher beschriebenen Membranpräparationen (vgl. Abb. 5 und 7) zeigt die Abnahme der [^3H]Oxymorphonbindung in so bestrahltem Gewebe nur mehr einen monoexponentiellen Verlauf. Eine "steile" Komponente ist nicht zu messen. Wie aus dem oben dargestellten zu ersehen ist, war diese bereits durch Weglassen des Lyophilisierungsschrittes reduziert. Bei Verzicht auf das Homogenisieren war sie völlig verschwunden.

Scatchardanalysen zeigten, daß auch bei diesen Probenpräparationen die Abnahme der spezifischen Bindung auf einer Reduktion der Menge der Rezeptoren, ohne signifikante Abnahme der Affinität des Liganden zum Rezeptor beruht.

In Abb. 15 ist die Strahleninaktivierung der [^3H]Oxymorphonbindung dargestellt. Die Steigung dieser monoexponentiellen Funktion beträgt $s = 7,1 \ (\pm 0,4) \text{ MGy}^{-1}$. Dieser Wert stimmt mit der Steigung der "flachen" Komponente sowohl in lyophilisierten, als auch in gefrorenen Membransuspensionen überein.

Aus der Steigung dieser monoexponentiellen Inaktivierungskurve läßt sich die Größe der Bindungseinheit nach Formel IV berechnen: Für die Bindung des [^3H]Oxymorphons ist demnach eine molekulare Einheit der Größe $91 \ (\pm 5,4) \text{ kDa}$ verantwortlich.

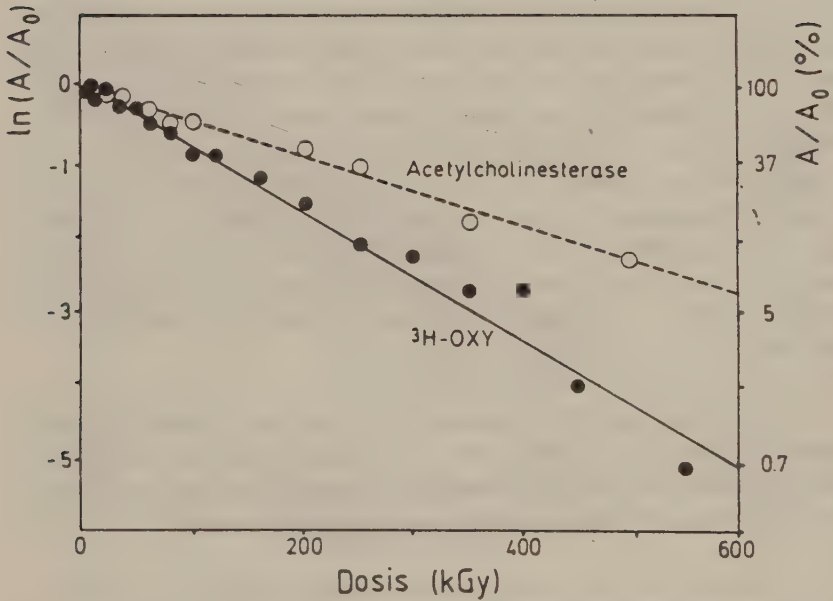


Abbildung 15: Rattengehirnschnitte wurden bei -70°C bestrahlt, und an diesen Membranen die spezifische $[^3\text{H}]$ Oxymorphonbindung gemessen. Die Daten ($\bullet$) sind Mittelwerte aus 9 unabhängigen Versuchen. Die Steigung dieser monoexponentiellen Inaktivierungskurve beträgt $s = 7,1 (+0,4) \text{ MGy}^{-1}$, was einer molekularen Größe von $91 (+5,3) \text{ kDa}$ entspricht. Als Größenvergleich wurde in denselben Membranen die Inaktivierung des Enzyms Acetylcholinesterase gemessen. Die abgebildeten Daten ($\circ$) sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen; die Steigung $s = 4,7 (+0,2) \text{ MGy}^{-1}$ entspricht einer Größe von $60 (+2,5) \text{ kDa}$.

In der nachfolgenden Übersicht sind drei verschiedenen Gewebepräparationen und die damit erhaltenen Ergebnisse schematisch dargestellt.

Schema der verschiedenen Gewebepräparationsschritte vor und nach der Bestrahlung bei den drei verschiedenen Präparationsarten

I	II	III
<u>Rattengehirne</u>		
Homogenisieren und Waschen	Homogenisieren und Waschen	Zerteilen in dünne Schnitte
	Tiefgefrieren	
Lyophilisieren	—	—
BESTRAHLUNG		
Rehydrieren und Rehomogenisieren	Rehomogenisieren	Homogenisieren
<u>Ergebnis:</u>		
biexponentielle Inaktivierungskurve (steile Komponente überwiegt)	biexponentielle Inaktivierungskurve (flache Komponente überwiegt)	monoexponentielle Inaktivierungskurve (entspricht der flachen Komponente)

3.5.2 Intakte NG 108-15 Zellen

Auch bei NG 108-15 Zellen, die ohne Homogenisieren als intakte Zellen im Wachstumsmedium gefroren und bestrahlt wurden, wird statt einer mehrphasischen eine monoexponentielle Inaktivierungskurve erhalten. Dies gilt sowohl für den Liganden [^3H]DADLE als auch für [^3H]Diprenorphin. Abbildung 16 zeigt die Inaktivierungskurve der [^3H]DADLE-Bindung.

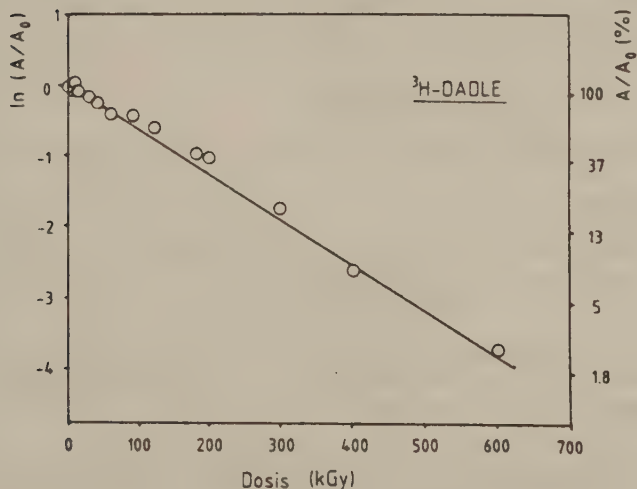


Abbildung 16: Dargestellt ist die spezifische [^3H]DADLE-Bindung an Membranen von NG 108-15 Zellen, die als intakte Zellen bei -70°C bestrahlt wurden. Die Steigung der Inaktivierungskurve beträgt $s = 6,2 (+ 0,5)$ MGy, was einer Größe von $79 \pm 6,6$ kDa entspricht. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus 7 unabhängigen Versuchen.

Der Einfluß des Wachstumsmediums während der Bestrahlung auf den Bestrahlungseffekt wurde dadurch untersucht, daß Zellen, die im Wachstumsmedium homogenisiert waren, neben solchen, die in TRIS-Puffer homogenisiert waren, ver-

glichen wurden mit Zellen, die als intakte Zellen im Wachstumsmedium bestrahlt wurden. Aus diesen Versuchen (Abb. 17) ergab sich, daß nicht die Abwesenheit des Mediums, sondern das Homogenisieren der Zellen für eine multiexponentielle Inaktivierung der Opioidbindung verantwortlich ist. Ein weiterer Hinweis, daß nicht die Zusammensetzung des Mediums während der Bestrahlung, sondern der Zustand der Zellmembran selbst essentiell für die Form der Inaktivierungskurve ist, ist die Tatsache, daß auch bei Bestrahlung intakter Zellen in PBS statt Medium eine monoexponentielle Kurve erhalten wird.

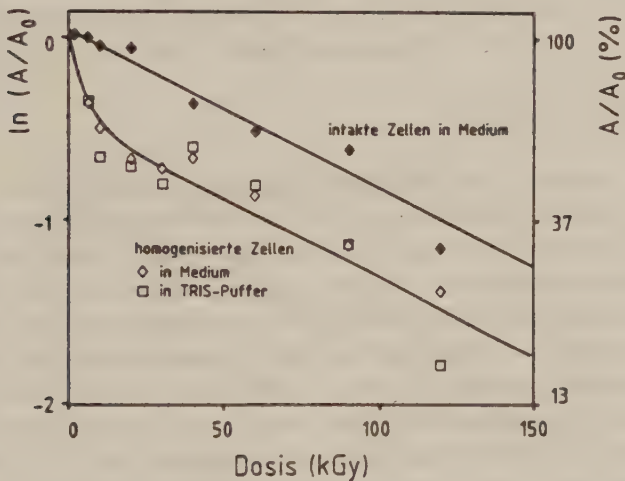


Abbildung 17: NG 108-15 Zellen wurden als intakte Zellen im Wachstumsmedium gefroren (◆) oder in diesem Medium homogenisiert (◇) oder in hypotonem TRIS Puffer homogenisiert (□). Alle 3 Präparationsarten wurden bei -70°C bestrahlt und danach die Opioidbindungsfähigkeit mit dem Liganden [^3H]DADLE bestimmt. Während bei Bestrahlung intakter Zellen eine monoexponentielle Inaktivierungskurve $s = 8,6 (\pm 0,5) \text{ MGy}^{-1}$ erhalten wurde, ist bei Bestrahlung der homogenisierten Zellen (◇ und □) jeweils eine biphasische Inaktivierungskurve zu beobachten [$p < 0,001$]. Dabei besteht kein Unterschied [$p = 0,8$] zwischen Homogenaten in Wachstumsmedium oder in TRIS-Puffer ($s_1 = 280 (\pm 100) \text{ MGy}^{-1}$, $s_2 = 8,6 (\pm 0,5) \text{ MGy}^{-1}$, $C_1 = 35 (\pm 4)\%$, $C_2 = 65 (\pm 3)\%$).

3.6. Bestimmung interner Standards in den drei vorgestellten Membranpräparationen

3.6.1. Flunitrazepambindung

Während bei der Opioidbindung abhängig von der Art der Membranpräparation - lyophilisierte oder gefrorene Membransuspensionen oder intakte Gewebeschnitte - unterschiedliche Inaktivierungskurven erhalten werden (siehe Schema Seite 71), besteht bei Inaktivierung der [^3H]Flunitrazepambindung kein Unterschied zwischen diesen Probenpräparationen. Abb. 18 zeigt, daß diese jeweils einer monoexponentiellen Funktion folgen. Aus den Steigungen berechnet sich eine molekulare Größe für den Flunitrazepamrezeptor von $82 \pm 3,5$ kDa.

3.6.2 Enzymkontrolle

Zur Kontrolle der Bestrahlungsdosis wurde bei den bestrahlten Proben exemplarisch die Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase bestimmt. In den Abb. 5, 7, und 15 sind die Inaktivierungskurven dieses Enzyms zusätzlich zur Inaktivierungskurve des Opioidrezeptors miteingezeichnet (durchbrochene Linien). Unabhängig von der Probenpräparation zeigt sich bei diesem Enzym, wie auch schon beim Flunitrazepamrezeptor, ein monoexponentieller Inaktivierungsverlauf. Die Steigungen der Inaktivierungskurven liegen bei $9,7 \text{ MGy}^{-1}$ (25°C) bzw. $4,7 \text{ MGy}^{-1}$ (70°C). Die daraus berechnete Größe des Enzyms Acetylcholinesterase von $61 \pm 3,3$ kDa entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (siehe Diskussion).

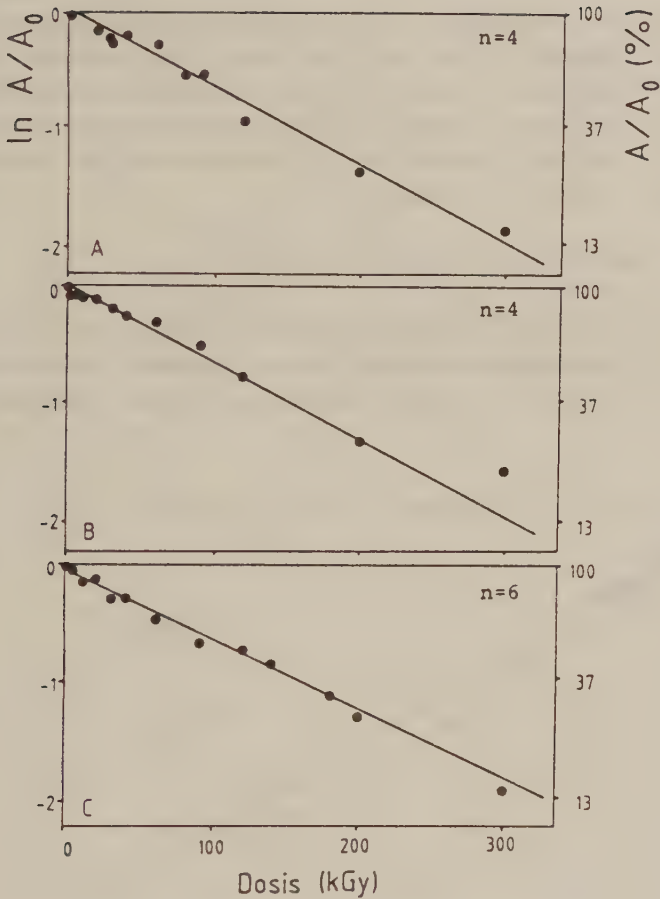


Abbildung 18: Die $[^3\text{H}]$ Flunitrazepambindung wurde an Ratten-
gehirnmembranen gemessen, die bei -70°C als

- A) lyophilisierte Membransuspension
- B) gefrorene Membransuspension
- C) intakte Gewebeschnitte

bestrahlt wurden. Die Daten sind Mittelwerte aus jeweils n Versuchen. Die Steigungen der drei Inaktivierungskurven sind nicht signifikant verschieden; $s = 6,4 (\pm 0,2) \text{ MGy}^{-1}$, was einer Größe von $82 (\pm 2,5) \text{ kDa}$ entspricht.

3.7 Die verschiedenen Opioidrezeptoren

Mit der Bestrahlung von "intaktem Gewebe" war eine Bedingung gefunden, bei der die Inaktivierungskurve nicht durch die Gegenwart einer steileren und sehr variablen Komponente kompliziert wurde. Diese Probenpräparation wurde daher im weiteren benützt, um die verschiedenen Opioidrezeptortypen genauer zu untersuchen.

3.7.1 Liganden verschiedener Selektivität

Wie bei den bis jetzt aufgeführten Experimenten wurden zunächst Inaktivierungskurven für verschiedene Opioidliganden mit unterschiedlicher Rezeptortypenpräferenz untersucht.

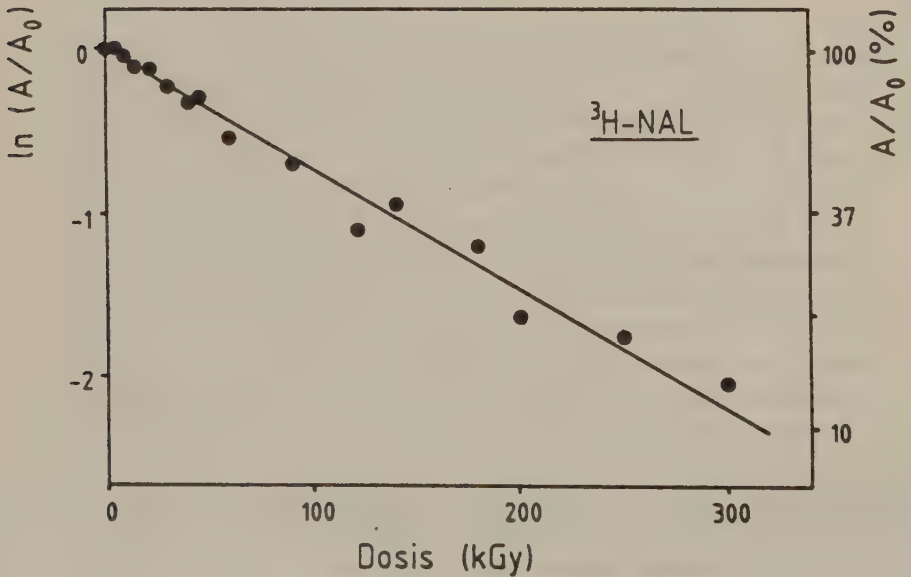


Abbildung 19: In Membranen von bestrahlten Rattengehirnen wurde die Abnahme der Opioidbindungsfähigkeit nach Bestrahlung mit dem Antagonisten [^3H]Naloxon getestet. Die berechneten Parameter sind in Tabelle V angegeben.

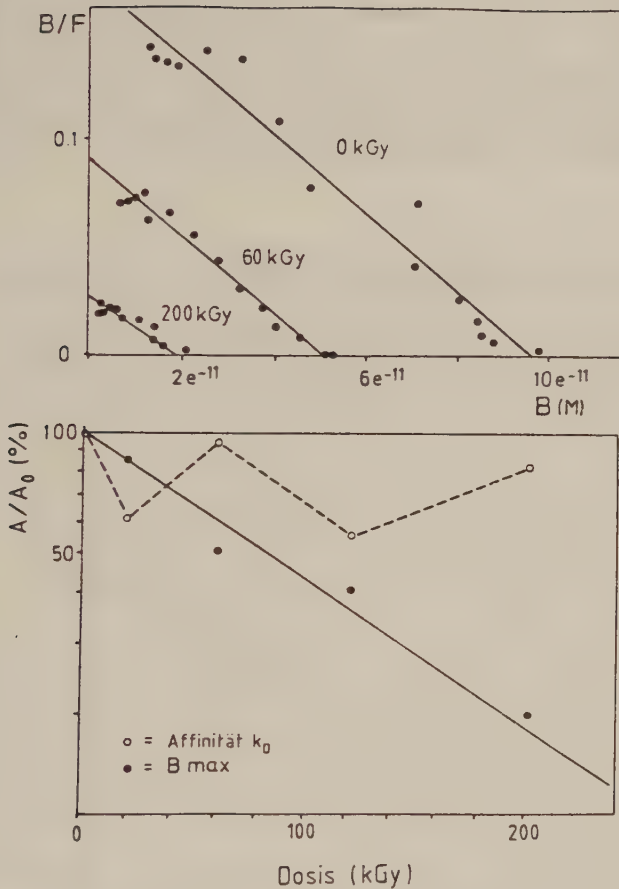


Abbildung 20: In Membranen von bestrahlten Rattengehirnen wurden für jede Strahlendosis Scatchardanalysen der [3 H]Bremazocinbindung durchgeführt. Aus diesen - in Teil (A) für drei Dosiswerte exemplarisch - dargestellten linearen Scatchard Plots wurden die Affinität des Bremazocins (K_D) sowie die Menge der Rezeptoren (B_{max}) bestimmt. In Teil (B) sind beide Parameter in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis aufgezeichnet: Während die Menge der Rezeptoren (●) mit steigender Dosis abnimmt ($s = 8,3 \text{ MGy}^{-1}$; $r = 0,98$), weisen die K_D Werte (○) keine signifikanten Unterschiede auf ($K_D = 0,74 \pm 0,1 \text{ nM}$).

Dabei wurde neben dem bereits gezeigten μ -Agonisten [^3H]OXY (Abb. 15) der ebenfalls μ -spezifische Antagonist [^3H]NAL (Abb. 19) untersucht, sowie der auch δ Rezeptoren markierende Agonist [^3H]DADLE, das [^3H]LOF, und die μ , δ und κ markierenden Liganden [^3H]BREM (Abb. 20), [^3H]EKC und [^3H]DIP verwendet (siehe Abb. 20 und Tab. V).

Tracer	Rezeptor- typ	Anzahl der Versuche	(MGY ⁻¹)	Molekular- gewicht (kDa)
[^3H]OXY	μ	9	$7,1 \pm 0,4$	$90,7 \pm 5,2$
[^3H]NAL	μ	14	$8 \pm 0,5$	$102,5 \pm 6,6$
[^3H]DADLE	δ	4	$8,5 \pm 0,8$	$109,3 \pm 10,6$
[^3H]EKC	μ, δ, κ	3	$7,2 \pm 1,1$	$91,8 \pm 13,5$
[^3H]BREM	μ, δ, κ	3	$8,5 \pm 0,7$	$108,9 \pm 9,2$
[^3H]DIPR	μ, δ, κ	13	$8,7 \pm 0,2$	$110,9 \pm 3,5$
[^3H]LOF	μ	10	$7,3 \pm 0,2$	$92,9 \pm 2,3$

Tabelle IV: Rattengehirnschnitte wurden intakt bei -70°C bestrahlt und die Opioidbindungsfähigkeit der Membranen mit verschiedenen selektiven Liganden getestet. Es wurden jeweils monoexponentielle Inaktivierungskurven erhalten. Die Steigungen s , sowie die daraus berechneten molekularen Größen sind angegeben.

Für alle diese Liganden zeigten die Inaktivierungskurven einen monoexponentiellen Verlauf. Die Abnahme der Bindung war auf eine Reduktion der $B_{\max}$ mit keiner wesentlichen Affinitätsänderung zurückzuführen (siehe z.B. Abb. 20). Die Steigungen der Inaktivierungskurven für die verschiedenen Liganden unterscheiden sich nicht deutlich voneinander (Tabelle IV).

3.7.2 Sequentielle Verdrängung des Liganden [^3H]Diprenorphin

Da alle verwendeten Liganden in ihrer Selektivität begrenzt sind, wurde zusätzlich die Methode der "sequentiell-

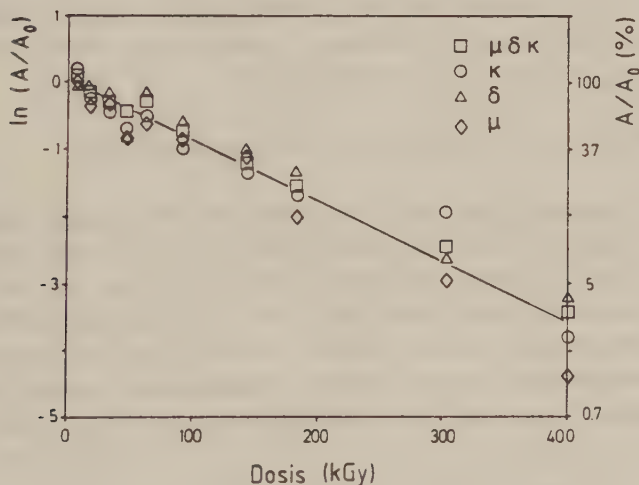


Abbildung 21: Durch "sequentielle Verdrängung" des Liganden [^3H]Diprenorphin wurde der Anteil der Bindung an den μ ($\diamond$), δ ($\triangle$) bzw. κ ($\circ$) Typ bestimmt (siehe Text). Durch EXPFIT-Analyse wurden für die 4 Inaktivierungskurven keine unterschiedlichen Steigungen festgestellt: $s = 9,1 \pm (0,7) \text{ MGy}^{-1}$. Dies entspricht einer Größe von $116 \pm 8,9 \text{ kDa}$. Das abgebildete Experiment ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

len Verdrängung" angewendet, um die Inaktivierung der einzelnen Rezeptortypen einzeln zu verfolgen.

Hierbei werden alle drei Opioidrezeptoren, μ , δ und κ mit dem nicht selektiven Liganden [^3H]Diprenorphin markiert. Der Anteil dieser [^3H]Diprenorphinbindung zum μ -Typ entspricht der durch 100 nM DAGO verdrängbaren Menge Tracer. In dieser Konzentration nämlich, bindet DAGO selektiv an den μ -Rezeptortyp. Aus dem durch zusätzliches Hinzufügen von 100 nM DADLE verdrängbaren Anteil von [^3H]Diprenorphin wird der Anteil der Bindung an den δ -Rezeptor bestimmt. Die unter diesen Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von DADLE (100 nM) und DAGO (100 nM), noch spezifisch gebundene Menge [^3H]Diprenorphin läßt sich hauptsächlich dem κ -Typ zuordnen (Magan et al., 1982). Auch die mit dieser Methode gewonnenen Inaktivierungskurven der drei Rezeptortypen weichen weder in der Form noch in der Steigung signifikant voneinander ab (Abb. 21).

3.7.3 Gewebe unterschiedlicher Rezeptorpopulation

Im Rattengehirn, an dem diese Untersuchungen durchgeführt wurden, finden sich hauptsächlich die Opioidrezeptoren des μ -Typs, während besonders der κ -Typ nur in geringer Menge vorkommt. Daher kann z.B. ein nur geringfügig kleinerer κ -Rezeptortyp schwer erkannt werden. Um die Größe der drei Rezeptortypen noch weiter zu überprüfen, wurden zusätzlich Gewebe, die eine höhere Menge eines der drei Typen aufweisen, untersucht.

NG 108-15 Tumorzellen stellen wie bereits erwähnt eine Membranpräparation dar, die ausschließlich den δ -Typ der Opioidrezeptoren enthält. Wie in Abschnitt 3.6. beschrieben, erhält man bei Bestrahlung von intakten Zellen sowohl für den Liganden [^3H]DADLE als auch [^3H]DIPR monoexponentielle Inaktivierungskurven, deren Steigungen sich nicht von denen im Rattengehirn unterscheiden (siehe Abb. 16).

Im Gehirn des Meerschweinchens und noch ausgeprägter im Froschgehirn liegt ein hoher Anteil an κ Rezeptoren vor. Diese Membranen, bestrahlt als intaktes Gewebe, wurden mit den beiden Liganden [^3H]DIPR und [^3H]BREM untersucht. Die Steigungen der monoexponentiellen Inaktivierungskurven sind in Tabelle V wiedergegeben.

Die hypothalamisch-thalamische Struktur des Gehirns ist ein Gewebe, das besonders reich an Rezeptoren des μ -Typs ist. Da dieser Teil bei der Ratte recht klein ist, wurde er Schweinegehirnen entnommen. Die Inaktivierungskurven für die Liganden [^3H]Oxymorphon bzw. [^3H]DIPR ergaben eine monoexponentielle Abnahme der Opioidbindung; die Ergebnisse sind in Tabelle V wiedergegeben.

	NG 108-15 (n = 6;7)	Froschgehirn (n = 2)	Meerschwein- chengehirn (n = 1)	Schweine- thalamus hypothala- mus (n=2)
[^3H]DIPR	8,6 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,7	8,7 $\pm$ 0,8	7,1 $\pm$ 0,6
[^3H]BREM	-	6,5 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,5	-
[^3H]OXY	-	-	-	6,5 $\pm$ 0,7
[^3H]DADLE	6,2 $\pm$ 0,5	-	-	-

Tabelle V: Gewebe mit unterschiedlicher Rezeptortypendominanz wurden (intakt) bei -70°C bestrahlt, und die Opioidbindungsfähigkeit dieser Membranen wurde mit den jeweils entsprechend selektiven Liganden getestet. Es wurden jeweils monoexponentielle Inaktivierungskurven erhalten. Die Steigungen $\pm$ SEM sind aus n Versuchen angegeben (beim Meerschweinchengehirn (n=1) ist der Fehler der Computeranpassung angegeben).

Bei Bestrahlung von intaktem Gewebe verläuft die Inaktivierung der Opioidbindung also in allen untersuchten Geweben monoexponentiell (siehe auch Abb. 22), und die Steigungen der Inaktivierungskurven weichen nicht signifikant voneinander ab (Tabelle V).

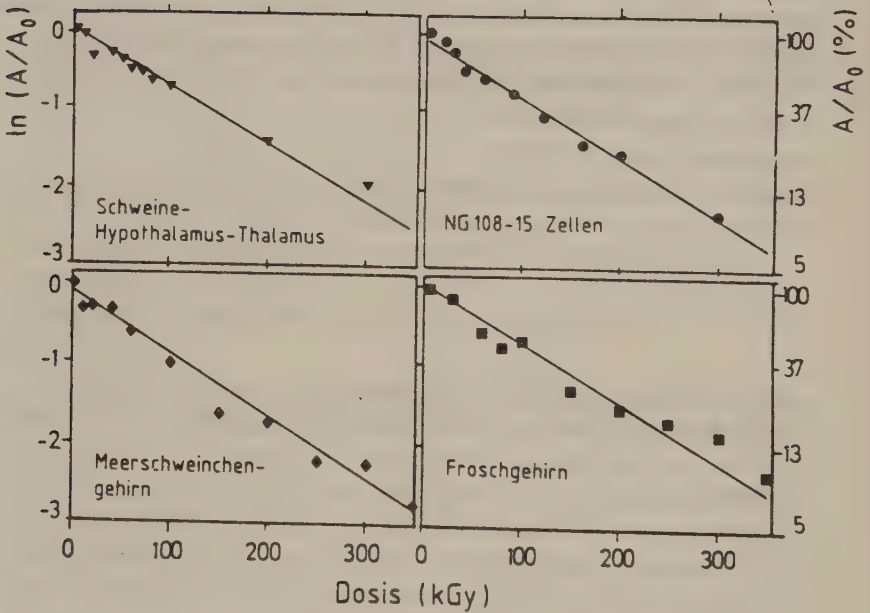


Abbildung 22: $[^3\text{H}]$ Diprenorphin an Membranen verschiedener Spezies: Mit Hilfe des EXPFIT-Programms wurde festgestellt, daß sich die Steigungen der 4 Inaktivierungskurven nicht signifikant unterscheiden; $s = 7,9 (+ 0,4) \text{MGy}^{-1}$, was einer Größe von $101 (+ 4,6) \text{kDa}$ entspricht. Die Anzahl der Experimente sowie die unabhängig voneinander berechneten Steigungen der dargestellten Kurven sind in Tabelle V zu finden.

Der Frage nach einer eventuell unterschiedlichen Strahleninaktivierung der Opioidrezeptortypen ist damit mit drei Untersuchungsmethoden nachgegangen worden: Weder der Gebrauch von verschiedenen selektiven Liganden, noch die sequentielle Verdrängung des nicht selektiven Liganden [^3H]Diprenorphin, oder die Untersuchung von 4 Gewebearten mit unterschiedlicher Menge dieser Rezeptortypen, lieferten einen Hinweis auf eine nichteinheitliche Größe des μ , δ -oder κ -Typs.

Der Mittelwert für die Steigung der Inaktivierungskurven der Opioidbindung berechnet sich aus 148 Experimenten mit $s = 7,7 \text{ (} \pm 0,3 \text{) MGy}^{-1}$. Dieser Wert entspricht einer molekularen Einheit von $98 \pm 5 \text{ kDa}$.

3.8 Opioidbindung in Gegenwart von Na^+ , Mg^{++} und GTP

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde die Untersuchung der Opioidbindung in hypotonem Puffer ausgeführt (TRIS, 50 mM). Aus Bindungsstudien war bekannt, daß der Opioidrezeptor durch die Ionen Na^+ und Mg^{++} sowie durch Guannucleotide (GTP) verändert wird (Blume, 1978). Durch die Anwesenheit dieser Bindungsmodulatoren wird die Affinität von Agonisten, nicht aber von Antagonisten zum Rezeptor vermindert. Der maximale Effekt auf die Opioidbindung wird nur durch Kombination der Bindungsmodulatoren erreicht. Weiterhin wurde festgestellt, daß die Anwesenheit von sowohl Na^+ , Mg^{++} als auch GTP notwendig ist, um einen Effekt der Opioide in vitro messen zu können (Blume, 1979). Der Rezeptor wurde daher unter diesen Bedingungen als im "funktionalen" Zustand angesehen.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob dieser veränderte Rezeptorzustand mit einer Veränderung der molekularen Größe zusammenhängt.

Die Vorbereitung der Proben, sowie die Bestrahlung als intakte Gewebeschnitte bzw. intakte NG 108-15 Zellen wurde nicht variiert. Zum Unterschied zu den vorangegangenen Ver-

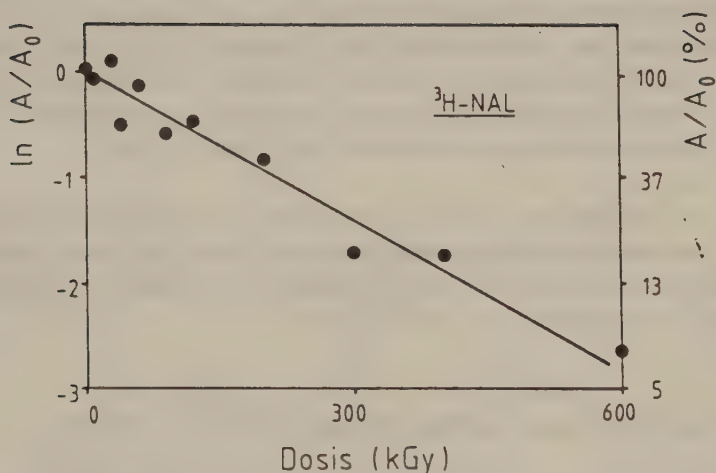


Abbildung 23: $[^3\text{H}]$ Naloxonbindung in Anwesenheit von Na^+ (100 mM), Mg^{++} (10 mM) und GTP (10^{-4} M) an Membranen, die als intakte Gehirne bestrahlt wurden. Die Steigung der Inaktivierungskurve beträgt $4,7 \pm 0,88 \text{ kGy}^{-1}$, was einer molekularen Größe von $60 \pm 12 \text{ kDa}$ entspricht. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

suchen wurde beim Radiorezeptorassay 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 sowie 0,1 mM GTP (oder dessen stabile Analoga) zum Inkubationsmedium hinzugefügt.

Unter diesen Versuchsbedingungen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Inaktivierungskurven von Opioidagonisten bzw. Opioidantagonisten beobachtet werden.

3.8.1. Opioidantagonisten

Abb. 23 zeigt die Bindung des Opioidantagonisten $[^3\text{H}]$ Naloxon, die in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP gemessen wurde. Die Inaktivierungskurve ist monoexponentiell, die

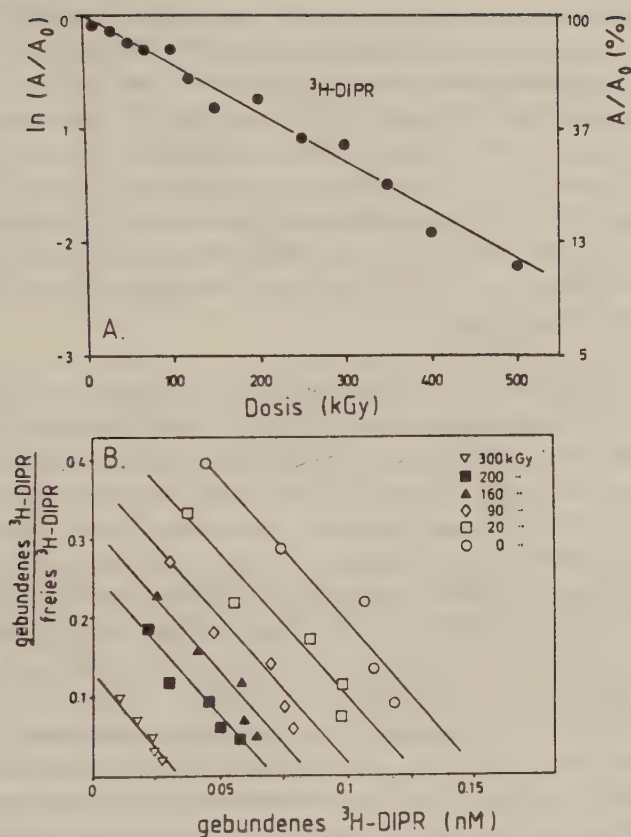


Abbildung 24: A) An Membranen von bestrahlten Rattengehirnen wurde die [^3H]Diprenorphinbindung in Anwesenheit von NaCl (100 mM), MgCl_2 (10 mM) und GTP (0,1 mM) bestimmt. Die Steigung der monoexponentiellen Inaktivierungskurve beträgt $s = 4,3 + 0,3 \text{ MGy}^{-1}$, was einer Größe von $55 \pm 4 \text{ kDa}$ entspricht. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. B) Bei einigen Bestrahlungsdosen wurde die [^3H]Diprenorphinbindung mit 5 verschiedenen Tracerkonzentrationen (0,2 - 2,2 nM) bestimmt. Die Membrankonzentration im Bindungstest betrug 10 mg Feuchtgewebe/ml. Die Affinität des [^3H]Diprenorphins blieb bei allen Bestrahlungsdosen gleich (0,28 nM). Die dargestellten Daten sind aus einem Versuch, dessen Ergebnis in einem weiteren, unabhängigen Versuch bestätigt wurde.

Steigung beträgt $4,7 \pm 0,88 \text{ MGy}^{-1}$. Dies ist eine deutlich flachere Steigung als diejenige der Inaktivierungskurve der [^3H]Naloxonbindung im hypotonen Puffer (Abb. 19). Das gleiche Ergebnis ergaben auch Versuche mit dem partiell antagonistischen Opioidligand [^3H]Diprenorphin (Abb. 24). Scatchardanalysen der Bindung dieses Liganden in Membranen von verschieden stark bestrahlten Rattengehirnen zeigen, daß die Abnahme der [^3H]Diprenorphinbindung auch in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP nur auf eine Reduktion der Anzahl der Bindungsstellen, und nicht auf eine Veränderung der Affinität zurückzuführen ist.

Analog zu diesem Ergebnis im Rattengehirn erhält man für die Inaktivierungskurve des [^3H]Diprenorphin in Na^+ , Mg^{++} und GTP auch bei als intakte Zellen bestrahlten Membranen von NG 108-15 Hybridzellen eine flachere Steigung von $3,7 \pm 0,2 \text{ MGy}^{-1}$. Das Ergebnis, daß unter diesen Bedingungen eine kleinere Einheit gemessen wird, ist also unabhängig vom untersuchten Opioidrezeptortyp ([^3H]Naloxon: μ ; [^3H]Diprenorphin im Rattengehirn: μ , δ und κ ; und in NG 108-15 Zellen: δ).

Aus den Steigungen der Inaktivierungskurven für die Bindung von partiellen und vollen Opioidantagonisten in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} sowie GTP berechnet sich eine Größe von $56 \pm 4,4 \text{ kDa}$ ($n = 20$), ein signifikant kleinerer Wert, als für die Opioidbindungseinheit in Na^+ , Mg^{++} - und nucleotidfreiem Puffer gemessen wurde (siehe 3.5.: $98 \pm 5 \text{ kDa}$).

3.8.2 Reine Opioidagonisten

Ein ganz anderes Bild ergibt sich, wenn die Strahleninaktivierung der Bindung von reinen Agonisten wie [^3H]Oxymorphon oder [^3H]DADLE in Anwesenheit der Bindungsmodulatoren Na^+ , Mg^{++} und GTP (oder der stabilen Analoga GMP-PNP oder GTP γ S) untersucht werden (es bestand kein Unterschied zwischen diesen drei analogen Substanzen). Abb. 25 zeigt A die dosisabhängige Abnahme der [^3H]Oxymorphonbindung in hypoto-

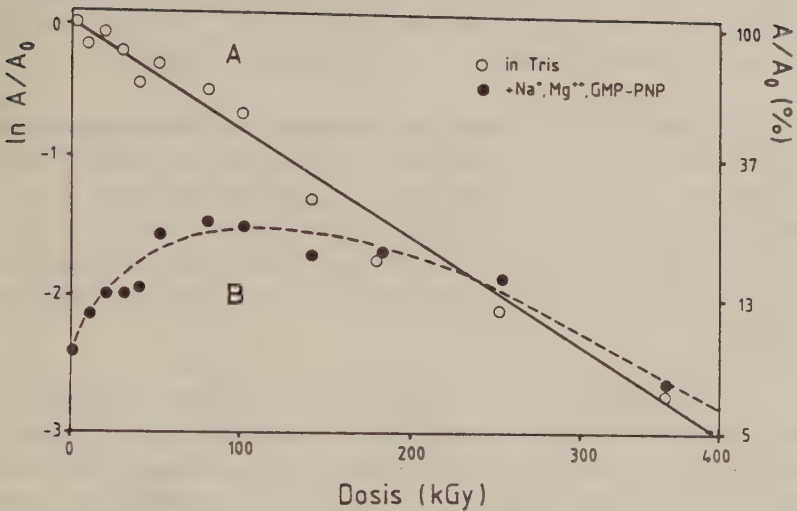


Abbildung 25: Rattengehirnschnitte wurden bei -70°C bestrahlt. In diesen Membranen wurde die $[^3\text{H}]$ Oxymorphonbindung A) in TRIS-Puffer (50 mM) und B) in Anwesenheit von NaCl (100 mM), MgCl_2 (10 mM) und GMP-PNP (10^{-5}M) untersucht. Die Meßdaten wurden alle als % der in Abwesenheit von Na^+ , Mg^{++} oder GMP-PNP gemessenen Oxymorphonbindung ausgedrückt. Sie entsprechen einem Versuch, der dreimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt wurde.

nem Puffer und (B) in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GMP-PNP. Beide Kurven wurden mit denselben bestrahlten Rattengehirnen erhalten. Zur besseren Übersicht sind alle Werte als % der $[^3\text{H}]$ Oxymorphonbindung der unbestrahlten Gehirnmembranen in hypotonem Puffer dargestellt. Wie schon oben erwähnt, ist die spezifische Bindung durch Na^+ , Mg^{++} und GMP-PNP erniedrigt. Durch Bestrahlung wird diese Bindung nicht etwa weiter erniedrigt, sondern vielmehr erhöht. Es ist ein Anstieg der Agonistenbindung auf etwa das 2-3 fache der Ausgangsbindung zu beobachten, dessen Maximum bei der Dosis von 80-100 kGy liegt. Bei höherer Bestrahlungsdosis nimmt die Menge des gebundenen Agonisten dann, in einem anscheinend monoexponen-

tiellen Verlauf, wieder ab. Das gleiche Bild einer Stimulierung der Bindung in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP durch Bestrahlung wird auch für $[^3\text{H}]\text{DADLE}$ beobachtet.

In Abb. 25 ist zu erkennen, daß der strahleninduzierte Bindungsanstieg einer Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber Na^+ , Mg^{++} und GMP-PNP gleichkommt: während diese Bindungsmodulatoren in unbestrahlten Membranen die Agonistenbindung um >80% reduzieren, ist nach Bestrahlung von ca. 200 kGy der Effekt von Ionen und GTP scheinbar eliminiert.

Um die Bindungsverhältnisse unter diesen Bedingungen genau zu untersuchen, wurden Scatchardanalysen der $[^3\text{H}]\text{Oxymorphon}$ bindung in Na^+ , Mg^{++} und GTP bei Membranen von verschieden stark bestrahlten Rattengehirnen durchgeführt. Es wurden jeweils nichtlineare Scatchard Plots erhalten (Abb. 26), die auf mehrere Rezeptoren verschiedener Affinitäten hindeuten. Durch Computeranalyse wurde festgestellt, daß sich sowohl die Menge der Rezeptoren als auch die jeweiligen Affinitäten mit steigender Dosis verändern. Durch Bestrahlung verschiebt sich dabei vor allem das Verhältnis der verschiedenen affinen Rezeptorzustände in der Membran, so daß nach einer Dosis von 40-90 kGy die Rezeptoren in einer höher affinen Form vorliegen als bei unbestrahlten Gehirnen. Daher kommt es zu einer Zunahme der spezifischen Bindung.

Dieses Ergebnis wurde auch in Membranen von bestrahlten NG 108-15 Zellen bestätigt. Die Gesamt-rezeptormenge wurde hier mit $[^3\text{H}]\text{Diprenorphin}$ markiert und dieses mit steigenden Mengen (10^{-9} - 10^{-5} M DADLE) verdrängt. Dieser Versuch ergab, daß die Gesamtmenge an Opioidrezeptoren mit steigender Bestrahlung abnahm, während sich gleichzeitig das Verhältnis der für DADLE verschieden affinen Rezeptorzustände veränderte. Der relative Anteil der höher affinen Form nahm zu.

Wegen dieser sehr komplexen Verhältnisse kann aus den Inaktivierungskurven der Agonistenbindung in Na^+ , Mg^{++} und

GTP nicht direkt auf eine molekulare Größe geschlossen werden. Noch weitere Untersuchungen sind nötig um Hinweise auf die molekularen Grundlagen dieser Effekte zu erlangen.

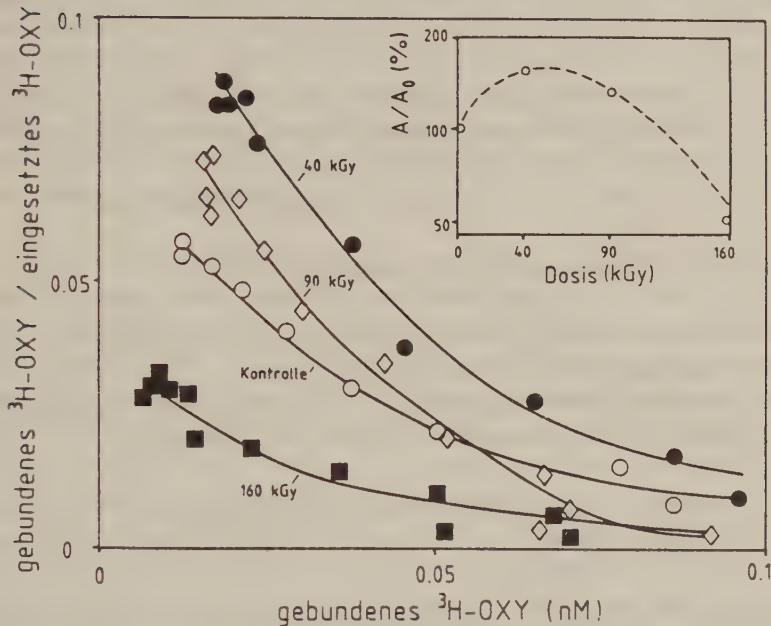


Abbildung 26: Rattengehirne wurden wie üblich bestrahlt. Die $[^3\text{H}]\text{Oxymorphon}$ bindung an diese Membranen wurde in Anwesenheit von Na^+ (100 mM), Mg^{++} (10 mM) und $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (10^{-5} M) mit steigender Konzentration von nicht-markiertem Oxymorphon verdrängt. Die Daten wurden mit Hilfe des SCAFIT-Computerprogramms als Scatchardplots dargestellt. Für jede Bestrahlungsdosis wurden zwei verschieden affine Rezeptorzustände gefunden:

0kGy:	$K_{d1} = 0,78\text{nM}$, $B_{\text{max}1} = 0,05\text{ nM}$ und $K_{d2} = 45\text{ nM}$, $B_{\text{max}2} = 0,28\text{ nM}$
40kGy:	$K_{d1} = 0,53\text{nM}$, $B_{\text{max}1} = 0,058\text{nM}$ und $K_{d2} = 62\text{ nM}$, $B_{\text{max}2} = 0,38\text{ nM}$
90kGy:	$K_{d1} = 0,33\text{nM}$, $B_{\text{max}1} = 0,025\text{nM}$ und $K_{d2} = 2\text{ nM}$, $B_{\text{max}2} = 0,06\text{ nM}$
160kGy:	$K_{d1} = 0,76\text{nM}$, $B_{\text{max}1} = 0,02\text{ nM}$ und $K_{d2} = 9\text{ nM}$, $B_{\text{max}2} = 0,08\text{ nM}$

In die Darstellung ist die entsprechende Inaktivierungskurve der $[^3\text{H}]\text{Oxymorphon}$ bindung eingeschoben. Abgebildet ist ein Versuch in dreifacher Bestimmung. In einem zweiten Versuch wurde ein entsprechendes Ergebnis erhalten.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Opioidrezeptor mit Hilfe der Methode der "TARGET SIZE ANALYSIS" untersucht. Die Ergebnisse sollen unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert werden:

1. Ursachen der nichtlinearen Inaktivierungskurven bei Bestrahlung von lyophilisierten oder gefrorenen Proben.
2. Die molekulare Größe der opioidbindenden Einheit.
3. Verschiedene Opioidrezeptortypen.
4. Die molekulare Größe der opioidbindenden Einheit in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP.
Erklärung des Unterschieds in der Größe zwischen Bindung in ionenfreiem und ionenhaltigem Milieu.
5. Grundlagen der komplexen Inaktivierungskurven für reine Opioidagonisten in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP.

4.1 Abhängigkeit des Inaktivierungsverlaufs von der Vorbereitungsart des Untersuchungsmaterials

Sowohl bei Bestrahlung von lyophilisierten Membranen, als auch von gefrorenen Hirnhomogenaten zeigt die Opioidbindung eine zweiphasische Strahleninaktivierung. Dabei weisen die Steigungen der steileren bzw. der flacheren Komponenten bei beiden Probenarten jeweils ähnliche Werte auf. Während bei lyophilisierten Proben allerdings der Anteil der steileren Komponente in der Inaktivierungskurve überwiegt, macht diese bei gefrorenen Membranen nur einen geringeren Teil aus. Werden Membranen als Gewebeschnitte, d.h. ohne vorhergehendes Homogenisieren, bestrahlt, so ist eine steilere Komponente nicht mehr zu erkennen. Die Inaktivierungskurve verläuft dann monoexponentiell; ihre Steigung entspricht derjenigen der flachen Komponente der beiden anderen Mem-

branpräparationen. Die verschiedenen Probenpräparate ergeben also nicht etwa grundsätzlich verschiedene Ergebnisse. Vielmehr werden nur zwei verschiedene Steigungen beobachtet, wobei die flachere bei allen bestrahlten Serien unverändert erhalten wird, die steilere hingegen nur bei Bestrahlung von gefrorenen oder gefriergetrockneten Homogenaten, mehr oder weniger stark ausgeprägt, hinzutritt. Es erhebt sich nun die Frage, wie sich nach der "Target Size" - Theorie die flache Komponente interpretieren läßt, und welche Bedeutung der unter bestimmten Umständen zusätzlich existierenden steileren Komponente zukommt.

Das Zustandekommen einer zweiphasischen Inaktivierung durch einen prinzipiellen, methodischen Fehler kann ausgeschlossen werden, da die Abhängigkeit der Form der Inaktivierungskurven von der Vorbereitungsart des Untersuchungsmaterials nur für den Opioidrezeptor beobachtet wurde. Sowohl das Enzym Acetylcholinesterase, als auch der Benzodiazepinrezeptor zeigten in allen bestrahlten Probenserien einen monoexponentiellen Aktivitätsverlust.

Für die Interpretation der biexponentiellen Inaktivierung beim Opioidrezeptor stehen zwei prinzipiell unterschiedliche Möglichkeiten offen: 1) Es existieren zwei verschieden große Moleküle mit Opioidbindungsfähigkeit (Größenunterschied der beiden Moleküle wäre ca. 6 bis 10 fach), oder 2) Es handelt sich um eine Verfälschung durch indirekte Effekte.

Zu 1) Ein Beispiel für eine nichtlineare Inaktivierungskurve, die auf zwei verschieden große Rezeptormoleküle zurückzuführen ist, stellt der Thrombinrezeptor aus menschlichen Blutplättchen dar (Harmon und Jamierison, 1985). Hier konnten durch Affinitätsmessungen zwei verschiedene Rezeptoren identifiziert werden, wobei der höher affine Rezeptor mit einem steileren Verlauf inaktiviert wurde (= größeres Molekül), während die flachere Komponente der Kurve (kleineres Molekül) einem Rezeptor von niedriger Affinität entsprach.

In diesem Fall nahm die gemessene Affinität in den bestrahlten Proben mit steigender Dosis ab, d.h. sie näherte sich der Affinität des kleineren Moleküls an (da die Zerstörung des größeren, affineren Moleküls überwog). Da allerdings bei den Opioidrezeptoren keine Veränderung der Ligandenaffinität gemessen wurde (siehe Abb. 8), könnte es sich hier allenfalls um zwei Rezeptormoleküle handeln, die trotz des scheinbar 6-10 fachen Größenunterschiedes, gleiche Affinität für alle untersuchten Opioidliganden aufweisen. Eine Korrelation der beiden Komponenten mit verschiedenen Opioidrezeptortypen ist daher ausgeschlossen.

Von besonderem Interesse für die Interpretation ist die Tatsache, daß die steilere, d.h. "größere" Komponente scheinbar durch Homogenisieren und in noch stärkerem Ausmaß durch den Lyophilisierungsschritt entsteht. Da es bei Lyophilisation häufig zu Aggregation von Molekülen kommt, könnte die größere Einheit als ein aus ca. 6-10 Monomeren bestehendes Aggregat gedeutet werden. Diese Erklärungsmöglichkeit wurde von Lai et al. (1984) vorgeschlagen, die in lyophilisierten, nicht aber in gefrorenen Membranhomogenaten, eine steile Komponente fanden. Allerdings stellt diese steilere Komponente in gefrorenen Homogenaten auch nur einen geringen Teil der Ausgangsbindung dar, und kann leicht übersehen werden, wenn nicht detaillierte Dosiswerte unter 10 kGy angewendet werden.

Bei solubilisierten Rezeptoren ist eine Aggregatbildung häufig die Ursache für eine fehlerhafte Größenbestimmung. Eine Übertragung dieser Erklärungsmöglichkeit auf die "Target Size Analysis" würde allerdings implizieren, daß jeder Treffer irgendwo innerhalb des Aggregats die Funktionsfähigkeit aller 6-10 Untereinheiten aufhebt. Prinzipiell kann ein solcher "Energietransfer" zwischen Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden, allerdings konnte gezeigt werden, daß bei Enzymen, die als Polymere vorliegen, ein solcher Energietransfer nicht stattfindet (Kempner und Miller, 1983). Weist das Monomer volle Enzymaktivität auf, so mißt man mit

der "Target Size Analysis" die Größe des Monomers (Schlegel, 1983). Ein Beispiel dafür ist die Acetylcholinesterase, die ein Polymer von 4-16 Untereinheiten darstellt (Massoulie, 1980); mit der "Target Size Analysis" wird jedoch die Größe des Monomers bestimmt (Doble und Iverson, 1982; Ferry et al., 1983a; Kepner und Marcey, 1968; Levison und Ellory, 1974; Ott et al., 1986b). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Bindungskräfte zwischen den einzelnen Elementen von Rezeptoraggregaten ganz anderer Natur sind, und somit einen Energietransfer zulassen. Die Erklärung der steilen Komponente als Ausdruck eines solchen Aggregats kann somit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Folgende Überlegungen lassen sie aber eher unwahrscheinlich erscheinen: 1) Wie kann es zu einer Aggregation während des Lyophilisierens (d.h. bei -70°C) kommen, obwohl die Rezeptoren in der Membran gebunden, d.h. fixiert vorliegen? 2) Wieso sind die Bindungskräfte, die zwischen den Untereinheiten herrschen, so stark, daß ein Energietransfer, der bisher nur bei kovalenten Bindungen beobachtet wurde, stattfinden kann, und 3) warum dissoziieren so stark gebundene Aggregate unmittelbar durch Berührung mit Wasser? Dieser letzte Punkt wird aus dem Versuch der Abb. 12 deutlich, wo gezeigt ist, daß ein Bestrahlen von lyophilisierten Membranen in Wasser, ohne Homogenisieren oder Quellenlassen, dasselbe Ergebnis liefert, wie bei nicht lyophilisierten Membranen. Dies deutet eher darauf hin, daß die An- bzw. Abwesenheit von Wasser bzw. Luft während der Bestrahlung den Unterschied zwischen lyophilisiert bestrahlten und als gefrorenes Homogenat bestrahlten Membranen hervorruft.

Zu 2) Eine alternative Interpretationsmöglichkeit für die nichtlinearen Inaktivierungskurven berücksichtigt die Möglichkeit von indirekten Bestrahlungseffekten. Obwohl für die "Target Size Analysis" unter solchen Bedingungen bestrahlt wurde, die indirekte Effekte weitgehend ausschließen, so müssen diese jedoch immer als Fehlerquellen im Auge behalten werden, vor allem dann, wenn unterschiedliche Ergebnisse mit lyophilisierten und gefrorenen Proben beobachtet werden (siehe Methodenteil).

Als sehr gewichtiger Hinweis auf indirekte Strahlenwirkungen wird das Vorhandensein eines "Verdünnungseffekts" angesehen (Alexander, 1961; Dale, 1943; Sommermeyer, 1959). Wie in Abschnitt 2.2.1 ausgeführt, tritt eine Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der Konzentration der Probe nur bei indirekten, nicht aber bei direkten Strahleneffekten auf. Die Tatsache, daß die Ausprägung der steilen Komponente, wie in Abb. 14 gezeigt, mit steigender Konzentration der Probe abnimmt, ist als Hinweis für die Beteiligung indirekter Strahleneffekte an dieser Komponente zu werten. Diese Versuche sagen andererseits nichts über die Ursache und Natur der indirekten Effekte aus. Zur Klärung dieser Frage sollten die weiterhin unternommenen Versuche beitragen.

Da die Radiolyseprodukte von Wasser die Hauptursache indirekter Effekte sind, liegt der Gedanke nahe, daß die Restfeuchtigkeit in lyophilisierten Membranen bei Bestrahlung bei Raumtemperatur genügend Radikale ergibt, die eine steilere Komponente verursachen können. Bestrahlung von lyophilisierten Membranen im gefrorenen Zustand lieferte aber - bis auf den Temperaturfaktor - kein von der Bestrahlung bei Raumtemperatur unterschiedliches Ergebnis; dadurch ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich.

Lyophilisierte Membranen bilden eine poröse schwammartige Schicht, bei der die Oberfläche, und damit der Kontakt mit Luftsauerstoff im Vergleich zu gefrorenen Membranen stark erhöht ist. Luft wird - wie im Methodenteil beschrieben - ebenfalls durch Bestrahlung angeregt, und kann somit zu chemischen Reaktionen mit Membranmolekülen führen. So konnte z.B. gezeigt werden, daß bei dem "Nucleotid-Transport-Molekül" durch Bestrahlung in lyophilisierten Membranen Oxidationsprozesse auftreten (Jarvis et al., 1980). Dadurch wurde eine zweiphasische Inaktivierung erhalten. Durch Bestrahlung der lyophilisierten Proben im Vakuum und unter Zusatz des Antioxidans DTT konnte die steile Komponente eliminiert werden. Die Inaktivierungskurve verlief dann monoexponentiell, die Steigung entsprach derjenigen der flachen Komponente bei Bestrahlung in Gegenwart von Luft. Die

Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen auf die Existenz einer essentiellen SH-Gruppe in der Bindungsstelle, die durch Bestrahlung in Luft oxidiert würde. In Vakuum und nach Zugabe des Antioxidans DTT waren diese sensitiven SH-Gruppen hingegen vor Oxidation geschützt. Für einige andere Enzyme wurde jedoch berichtet, daß die Gegenwart von DTT während der Bestrahlung im Gegenteil zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit führte (Martin, 1983). Die Wirkungsweise dieser Substanzen (Protektion oder Sensibilisierung) ist also nicht klar definiert und scheinbar von den Eigenschaften des untersuchten Moleküls abhängig. Im vorliegenden Fall des Opioidrezeptors wurde durch Bestrahlung in Vakuum oder durch Austausch der Luft mit Helium keinerlei Veränderung bewirkt. Auch der Zusatz von DTT, Cystein oder des lipophilen Antioxidans α -Tocopherol führte zu keiner Reduktion der steilen Inaktivierungskomponente. Somit konnte im Fall der Opioidrezeptoren kein eindeutiger Hinweis für eine Beteiligung von Oxidationsprozessen gewonnen werden.

Homogenisation und Lyophilisation stellen einen starken Eingriff in die natürliche molekulare Anordnung der Zellmembran dar. Dadurch könnten sensitive Gruppen, die normalerweise geschützt innerhalb der Membran liegen, exponiert werden, und dann leicht für Radiolyseprodukte angreifbar werden. Dies könnte erklären, warum im Falle intakter Zellmembranen die indirekten Effekte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 17). Eine analoge Erscheinung beschreibt Menzel (Menzel, 1976), wonach Lipide einer intakten Zellmembran gegen Oxidation durch Ozon (das ja durch Bestrahlung aus Luftsauerstoff entsteht) geschützt sind. Das Aufbrechen der molekularen Membranstruktur durch Zellhomogenisation führt zu einer verstärkten Peroxidation der Membranlipide.

Die Bedeutung von Lipiden für die Opioidbindung wurde bereits erwähnt (Lee und Smith, 1980). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch Ascorbinsäure (Dunlap et al., 1979) sowie durch Fe^{2+} -Ionen (Pasternak et al., 1975), die beide Peroxidationen von Membranlipiden katalysieren (Bishayee und

Balasubramanian, 1971), die Opioidbindung reduziert wird. Auffällig dabei ist, daß Ascorbinsäure nur in Membranhomogenaten die Opioidbindung reduziert, während sie im biologischen Test am isolierten Meerschweinchenileum (=intaktes Gewebe) keine Wirkung zeigte. Auf Grund dieser Parallelen scheint es wahrscheinlich, daß Lipidperoxidationen auch bei den indirekten Bestrahlungseffekten eine Rolle spielen.

Die Erklärung der "steilen Komponente" als Ausdruck eines indirekten Bestrahlungseffektes würde damit durch eine Kombination von zwei Effekten möglich: Die Zerstörung der Membran führt zu einer gewissen Veränderung der Umgebung des Rezeptors, z.B. zu einer Exponierung von empfindlichen Gruppen, vielleicht ungesättigten Fettsäuren. Diese "Vorschädigung" hat zwar selbst noch keinerlei Verlust der Opioidbindungsfähigkeit zur Folge, ermöglicht aber dann die chemische Zerstörung des Rezeptors durch Radiolyseprodukte. Im intakten Gewebe hingegen wäre der Rezeptor sowie seine nähere Lipidumgebung in der unveränderten Membran eingebunden, und somit vor chemischer Inaktivierung durch indirekte Effekte geschützt.

Diese Erklärung könnte jedoch nicht belegt werden, da weder DTT noch das lipophile α -Tocopherol eine Schutzfunktion zeigten. Wenn also auch die Natur der indirekten Effekten nur vermutet werden kann, so ist doch durch die Verdünnungsversuche eindeutig nachgewiesen, daß indirekte Effekte für die steile Komponente der Inaktivierungskurve verantwortlich sind. Somit liegt der steilen Komponente keine zusätzliche größere molekulare Einheit zu Grunde. Für die flachere Komponente hingegen war keine Beteiligung indirekter Effekte zu erkennen; daher darf angenommen werden, daß diese Steigung der Inaktivierung auf Grund direkter Effekte entspricht. Zur Berechnung der "Target Size" kann daher nur die Steigung der flacheren Komponente verwendet werden, da nur diese die Größe der molekularen Einheit widerspiegelt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts ist es daher zweckmäßig, Bedingungen zu wählen, unter denen die steile Komponente unterdrückt wird.

4.2 Größenbestimmung der die Opiode hochaffin bindenden Einheit

Bei Bestimmung der molekularen Größe aus der Steigung der Inaktivierungskurve müssen folgende Voraussetzungen beachtet werden: 1) Der Inaktivierung dürfen ausschließlich direkte Effekte zugrundeliegen. Im vorhergehenden Teil der Diskussion ist gezeigt worden, daß dies für die steile Komponente der Inaktivierungskurven nicht zutrifft, wohl aber für die flachere Komponente, da diese unabhängig von der Konzentration in der bestrahlten Probe, und unabhängig von der Art der Probenvorbereitung (gefroren oder gefriergetrocknet) konstant bleibt. 2) Die Inaktivierung der Opioidbindung muß ausschließlich auf einer Abnahme der Zahl der Bindungsstellen (ohne Veränderung der Affinität) beruhen ("Alles-oder-Nichts"-Forderung). Diese Forderung ist, wie Scatchardanalysen zeigten, erfüllt. 3) Die Bestrahlungsintensität (Dosimetrie) und die Berechnungsmethode (z.B. Temperaturfaktor) muß durch eine Kalibrierung mit Hilfe interner Standards überprüft werden. In dieser Arbeit wurde daher vergleichend die Größe des Benzodiazepinrezeptors, und die des Enzyms Acetylcholinesterase bestimmt. Übereinstimmend mit den Angaben in der Literatur wurden für beide, unabhängig davon, ob gefrorene oder gefriergetrocknete Membranen bestrahlt wurden, lineare Inaktivierungskurven erhalten.

Die Größe des Enzyms Acetylcholinesterase wurde mit ca. 61 +/- 3 kDa berechnet, und liegt damit im Rahmen der in der Literatur angegebenen Werte (Doble und Iversen, 1982: 65 kDa; Ferry et al., 1983a: 64 kDa; Kepner und Macey, 1968: 56 kDa; Levinson und Ellory, 1974: 75 kDa).

Für den Benzodiazepinrezeptor bestimmten wir eine Größe von 82 +/- 3,5 kDa. In der Literatur sind Werte von 200 kDa (Chang et al., 1981), 89 kDa (Doble und Iversen, 1982), 76 kDa (Ferry et al., 1983b) 57 kDa (Paul et al., 1981) und 50 kDa (Nielson et al., 1985) zu finden. Bei der Beurteilung dieser Werte muß beachtet werden, daß beim Benzodiazepinre-

zeptor sowohl die Anwesenheit von Cl^- (ca. 135 mM in dieser Studie), als auch von endogenem GABA im Radiorezeptortest die Bindung, und damit die Target Size Analysis beeinflussen (Doble und Iversen, 1982). Da diese Studie sich nicht mit dem Benzodiazepinrezeptor-Chloridkanal-GABA-Rezeptor-Komplex (Nielsen et al., 1985) befassen sollte, wurde nicht versucht, die Ursache jener Unterschiede selbst zu klären. Wir schickten daher von uns bestrahlte Rattengehirne zu Dr. M. Nielson (St. Hans Hospital, Dänemark), der für 3 verschiedene Enzyme, sowie für den Benzodiazepin- und den TBPS-Rezeptor dieselben Ergebnisse, wie mit den von ihm bestrahlten Rattengehirnen (Nielson und Braestrup, 1983) erhalten konnte.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß unsere Ergebnisse mit internen Standards und der Vergleich mit einem anderen Labor sowohl die Bestrahlungsmethode als auch die Größenberechnung mit Formel IV (siehe Abschnitt 2.1.3) als gesichert gelten lassen.

Wie im ersten Teil der Diskussion ausgeführt, kann zur Größenberechnung des Opioidrezeptors von der in allen Inaktivierungskurven unverändert zu findenden Steigung s_2 von 7,7 ($\pm 0,3$) kGy^{-1} ($n=148$) ausgegangen werden. Aus dieser Steigung berechnet sich die Größe von 98 ± 5 kDa. Nach der Theorie der Target Size Analysis gibt dieser Wert die Größe der Struktur an, die für die untersuchte Funktion (= hoch-affine Bindung der Opioiden) verantwortlich ist. Dabei kann wie in Abschnitt 2.3 dargelegt, nichts darüber ausgesagt werden, ob dies ein einziges Molekül ist oder ob es sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt.

Dieser Wert (98 kDa) wurde nach unserer ersten diesbezüglichen Publikation (Ott et al., 1983) in einer Arbeit von Lai et al. (1984) bestätigt; er ist aber um etwa die Hälfte kleiner, als die von McLowhan et al. (1983) publizierte Größe von 200 kDa. Allerdings bestrahlte diese Arbeitsgruppe lyophilisierte Zellmembranen in Anwesenheit von 0,33 M Saccharose. Bestrahlung von lyophilisierten Membranen führt, wie

oben ausgeführt, zu Komplikationen auf Grund zusätzlicher indirekter Inaktivierungseffekte. McLowhan hat allerdings keinen Versuch unternommen, zwischen direkten oder indirekten Effekten zu unterscheiden. Des weiteren finden sich Hinweise in der Literatur, daß Bestrahlung in Anwesenheit von Saccharose einerseits zu einem Protektionseffekt (Braams et al., 1958), andererseits aber auch zu weiteren indirekten Strahleneffekten auf Grund von cytotoxischen Radiolyseprodukten der Saccharose führen kann (Schubert und Sanders, 1971). Die Anwesenheit hoher Konzentrationen von Saccharose sollte daher während der Bestrahlung vermieden werden. Dies zeigt, wie wichtig es ist, bei Größenberechnungen mittels "Target Size Analysis" zwischen direkten und indirekten Strahleneffekten zu unterscheiden.

4.3. Verschiedene Opioidrezeptortypen

Die Opioidrezeptortypen können auf Grund der unterschiedlichen Affinitäten der Opioidliganden in Bindungsstudien unterschieden werden (Zukin und Zukin, 1984). Über eine eventuell unterschiedliche Struktur dieser Typen ist bisher nichts bekannt. Die Methode der "Target Size Analysis" ist besonders gut geeignet, um etwaige Größenunterschiede zwischen den einzelnen Typen aufzuzeigen. Dazu werden die Inaktivierungskurven für die Bindung von Liganden verschiedener Selektivität miteinander verglichen.

Aus Abschnitt 1 der Diskussion geht bereits hervor, daß die oben erwähnte Mehrkomponentenkurve nicht mit verschiedenen Opioidrezeptoren in Zusammenhang gebracht werden kann, da die Nonlinearität unabhängig von der Selektivität des verwendeten Liganden, andererseits aber abhängig von der Behandlung der Probe vor der Bestrahlung ist.

Auch bei der Bestrahlung von intakten Gewebeschnitten ergab sich für alle untersuchten Liganden dasselbe Ergebnis. Daraus wurde eine einheitliche Größe von 98 ± 5 kDa für die verschiedenen Opioidrezeptoren berechnet. Lai et al. (1984) untersuchten in der bereits erwähnten Studie ebenfalls ver-

schiedene Opioidliganden und bestimmten für δ und μ markierende Liganden eine identische Größe von ca. 100 kDa. Da sie mit dem auch κ -bindenden [^3H]Etorphin eine deutlich abgeflachte Inaktivierungskurve feststellten, schlossen sie, daß der κ -Typ eine Größe von nur 30 kDa aufweise. In unseren Versuchen mit den sowohl μ -, δ -wie auch κ -Rezeptor markierenden Liganden [^3H]DIPR, [^3H]EKC und [^3H]BREM ergab sich jedoch keinerlei Hinweis auf eine kleinere Größe des κ -Rezeptortyps. Allerdings ist gerade die Bestimmung des κ Typs leicht mit einer Ungenauigkeit behaftet, da für diesen Rezeptortyp kein selektiv markierender Ligand zur Verfügung steht. Im Rattengehirn stellt der κ -Typ außerdem nur ca. 12-20% (Maurer, 1982) der Opioidrezeptoren. Wird nun die Opioidbindung mit einem nicht sehr selektiven Liganden (wie DIPR, EKC oder BREM) markiert, so fällt eine so geringe Menge eines eventuell kleineren κ -Rezeptors kaum ins Gewicht. Durch Simulation stellten wir fest, daß z.B. 10% eines um die Hälfte kleineren Rezeptortyps nur zu einer geringfügig flacheren Inaktivierungskurve führen, und die Krümmung einer solchen Kurve erst bei sehr hoher Dosis offenkundig wird. Eine genaue Bestimmung der Bindung in diesen hohen Dosisbereichen ist aber wegen des geringen Unterschieds von unspezifischer zu spezifischer Bindung nicht mehr möglich. Kleinere Fehler in der Bestimmung der unspezifischen Bindung, oder eine geringe Veränderung in der unspezifischen Bindung, wie sie bei sehr hoher Dosis ($> 600 \text{ kGy}$) z.B. für [^3H]BREM beobachtet wurde, erschweren zusätzlich die Feststellung einer geringen Krümmung der Inaktivierungskurve.

Daher wurden noch weitere Versuche zur Klärung der Größe speziell des κ -Typs unternommen. Durch die Methode der sequentiellen Verdrängung (Magnan et al., 1982), bei der jeweils der Anteil der [^3H]DIPR-Bindung zu den δ -, μ - und κ -Typen getrennt untersucht werden kann, ergab sich ebenfalls kein Hinweis auf eine unterschiedliche Inaktivierung der einzelnen Rezeptortypen. Allerdings kann auch hierbei der κ -Typ nicht voll befriedigend erfaßt werden. Der μ - und δ -Anteil kann zwar gut bestimmt werden, als κ -Anteil wird aber einfach der nach Zugabe von DADLE und DAGO in "selektiven"

Konzentrationen nicht verdrängte Anteil der spezifischen Tracerbindung angenommen. Die auf diesen Anteil treffende Menge Radioaktivität ist aber sehr gering (und kann daher nicht sehr genau bestimmt werden). Die Bindung kann außerdem durch weitere unbekannte Bindungskomponenten "verfälscht" sein.

Um diesen Unsicherheiten zu begegnen, wurden weitere Gewebe untersucht, in denen die einzelnen Opioidrezeptortypen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorkommen; NG 108-15 Zellen, die nur Opioidrezeptoren vom δ -Typ enthalten, Schweine(hypo)thalamus, wo der μ -Typ vorherrscht, und das hauptsächlich κ enthaltende Froschgehirn und Meerschweinchengehirn. Es wurde auch hier jeweils die gleiche Größe für die opioidbindende Einheit gemessen, also auch keine signifikanten Speziesunterschiede angetroffen.

Somit war in drei verschiedenen methodischen Ansätzen ("selektive" Liganden, sequentielle Verdrängung sowie Gewebe verschiedener Rezeptortypendominanz) kein Anhaltspunkt für eine unterschiedliche molekulare Größe der Opioidrezeptortypen zu gewinnen. Im Rahmen des experimentellen Fehlers der Methode von $\pm 15\%$ (Kempner und Schlegel, 1979) weisen also sowohl μ - und δ - als auch κ -Rezeptoren eine Größe von ca. 98 kDa auf.

Von einer gleichen Größe kann allerdings nicht auf Identität dieser Moleküle geschlossen werden. So führen geringe Unterschiede in nur wenigen Aminosäuren, was bereits eine deutliche Veränderung der chemischen Eigenschaften eines Rezeptors und damit der Ligandenaffinitäten bewirken kann, nicht zu einem ausgeprägten Größenunterschied. Als Beispiel kann an die drei endogenen Opioid-präkursor-moleküle erinnert werden, die, obschon sie gleiches Molekulargewicht aufweisen, sich als unterschiedliche Moleküle herausstellten (Höllt, 1983).

Neben der gleichen Größe fiel auf, daß die unterschiedlichen Rezeptortypen ebenfalls die gleiche Sensitivität ge-

genüber Bestrahlungsartefakten, d.h. chemische Veränderungen durch indirekte Effekte wie sie bei Bestrahlung von lyophilisierten Membranen auftraten, aufweisen. Auf welche Reaktionen diese Effekte auch zurückzuführen sein mögen, die Tatsache, daß alle untersuchten Liganden gleichermaßen beeinflusst werden, deutet auf strukturelle Ähnlichkeiten der Rezeptortypen hin.

Denkbar wäre, daß die verschiedenen Opioidrezeptortypen sich aus einem gemeinsamen Vorläufer durch Mutation entwickelt haben, so daß nur geringe Unterschiede existieren. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den verschiedenen Typen um dasselbe Rezeptormolekül handelt, die Rezeptor-Ligand-Interaktion aber durch eine unterschiedliche Umgebung des Rezeptors beeinflusst wird.

Es bleibt daher unklar, warum Lai et al. (1984) für den Liganden [^3H]Etorphin eine stark abgeflachte Inaktivierungskurve erhielten. Eine Erklärungsmöglichkeit liegt vielleicht darin, daß gerade [^3H]Etorphin eine starke Tendenz zu "spezifischer" Filterbindung aufweist (Glasel und Venn, 1984). Eine solche Filterbindung führt zu einer Abflachung der Inaktivierungskurve, da sie bestrahlungsunabhängig ist. Dieses Phänomen ist bei dem σ -Liganden SKF 10046 besonders ausgeprägt, und wir erhielten für diesen Liganden eine Inaktivierungskurve, die der von Lai et al. für [^3H]Etorphin gezeigten ähnelt. Auch beim Zentrifugationsassay ergibt sich für SKF 10046 eine verdrängbare Bindung an das Probengefäß (Daten nicht gezeigt). Dieser Ligand eignet sich daher nicht für eine Untersuchung mittels Target Size Analysis.

Im Gegensatz zu den Opioidrezeptortypen konnten für andere Rezeptortypen Größenunterschiede mit der Target Size Analysis gefunden werden, so z.B. bei den Vasopressinrezeptoren V_1 und V_2 (Crause et al., 1984), den Serotoninrezeptoren 5HT_1 und 5HT_2 (Nishino und Tanaka, 1985), den Dopaminrezeptoren D_1 und D_2 (Nielson et al., 1984), sowie den α_1 bzw. α_2 adrenergen Rezeptoren (Agrawal et al., 1986).

Für diese Rezeptortypenpaare wurde außer verschiedenen Bindungseigenschaften auch festgestellt, daß sie an unterschiedliche Effektorsysteme gekoppelt sind. Bei den Opioid-rezeptortypen konnte solch ein Unterschied nicht gezeigt werden, das Effektorsystem Adenylatzyklase ist nur für den δ Rezeptor bekannt, für die μ - und κ -Typen konnte bis jetzt weder dasselbe noch ein unterschiedliches Effektorsystem nachgewiesen werden.

In diese Arbeit wurden nur die drei wichtigsten Opioid-rezeptortypen, μ , δ und κ berücksichtigt. Andere Typen wie der ϵ -Rezeptor wurden nicht miteingeschlossen, da das ϵ -spezifische [^{125}J] β -Endorphin zu über 50% unspezifisch gebunden ist, und sich daher mit diesem Liganden bei hochbestrahlten Proben die spezifische Bindung nicht exakt genug bestimmen läßt.

4.4. Größenunterschiede in der Bindungseinheit für Opioidantagonisten in Anwesenheit und in Abwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP

Schon gleich nach der Entdeckung des Opioidrezeptors wurde erkannt, daß die Bindung der Opioide durch den Zusatz von Ionen zum Inkubationsmedium beeinflusst wird (Pert und Snyder, 1973b). Zunächst wurde hauptsächlich die Wirkung der Na^+ Ionen untersucht; bald zeigte sich aber, daß auch Mg^{++} und GTP (Blume, 1978) einen Einfluß auf die Opioidbindung ausüben. Besonders auffällig war die Tatsache, daß diese Modulatoren zwischen der Bindung eines Agonisten und Antagonisten unterscheiden können: während in Anwesenheit von Na^+ Ionen und GTP die Agonistenbindung reduziert ist, ist in diesem Fall die Antagonistenbindung sogar erhöht (Pert et al., 1973; Childers und Snyder, 1980). Dies führte zu der Vorstellung, daß der Rezeptor in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann, wovon eine den Agonisten, die andere den Antagonisten bevorzugt bindet. Man nahm ferner an, daß das Gleichgewicht zwischen der "Agonistenform" und der "Antagonistenform" durch Na^+ -Ionen allosterisch zur Antago-

Antagonistenform hin verschoben werde. (Simon und Groth, 1975).

Die Wirkung der Na^+ -Ionen und des GTP sind im Prinzip gleich (=Erniedrigung der Affinität des Agonisten, mit geringer Wirkung auf den Antagonisten, dessen Bindung erhöht wird). Die maximale Wirkung auf die Opioidbindung wird nur durch die Kombination beider Modulatoren erreicht. In der "Target Size Analysis" sollen möglichst extreme Zustände miteinander verglichen werden (Martin, 1983), da es bei unvollständigem Übergang einer Rezeptorform in eine andere komplexe, gekrümmte Kurven erhalten würden. Daher wurden in dieser Arbeit die Modulatoren Na^+ , Mg^{++} und GTP jeweils in maximaler Konzentration zugegeben. Der Rezeptor liegt unter diesen, im Vergleich zu TRIS-Puffer physiologischen Bedingungen in einem sogenannten "funktionalen" Zustand vor, da nur unter diesen Bedingungen in vitro auch ein rezeptorvermittelter Effekt gemessen werden kann (Blume, 1979).

Die "Target Size Analysis" zeigte, daß die gleichen Modulatoren, welche den Rezeptor in einen "funktionalen" Zustand überführen, auch dessen funktionale Größe verändern. Bei der in Na^+ , Mg^{++} und GTP gemessenen Inaktivierungskurve wurde außerdem ein deutlicher Unterschied zwischen den antagonistischen Liganden und den reinen Agonisten gefunden.

Es sollen zunächst die Daten, wie sie für Antagonisten (und partielle Agonisten) in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP erhalten wurden, diskutiert werden.

Eine Größenbestimmung nach der Target Size Theorie aus den Steigungen der Inaktivierungskurven ist für diese Liganden auch in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP ohne zusätzliche Annahmen möglich, da die Kurven einerseits einer einfachen monoexponentiellen Inaktivierung folgen, und andererseits die Abnahme der Opioidbindung einzig auf eine Reduktion der Menge der Bindungsstellen zurückgeführt werden konnte (siehe Abb. 24). Damit sind die Voraussetzungen zur Anwendung der Formel IV (siehe Abschnitt 2.1.3.) gegeben.

Die berechnete Größe von 56 ± 4 kDa ist deutlich kleiner als die für dieselben Liganden in denselben Membranen in Abwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP gefundenen Größe von ca. 98 kDa.

Es soll noch einmal erwähnt werden, daß die Ionen (Na^+ , Mg^{++}) sowie das GTP nicht vor der Bestrahlung zugegeben wurden, so daß es sich hierbei nicht etwa um einen Protektions-effekt durch die höhere Salzkonzentration handeln kann. Der Größenunterschied hängt vielmehr einzig von der Art des Bindungstests, d.h. Opioidbindung in Na^+ -freien Puffer bzw. in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP, ab.

Dies bedeutet, daß für die Opioidantagonistenbindung in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP eine Struktur der Größe 56 kDa ausreicht, während im ionenfreien Medium zur Bindung des Antagonisten (und des Agonisten) eine Struktur der Größe 98 kDa notwendig ist. Die einfachste Erklärung hierfür ist, daß eine zusätzliche makromolekulare Struktur von etwa 42 kDa zu der 56 kDa großen Einheit hinzutreten muß, um im ionenfreien Medium die hochaffine Opioidbindung zu bewirken. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um zwei völlig unabhängige Molekülstrukturen, eine von 56 kDa und eine andere von 98 kDa Größe, handelt. Die Relevanz eines solchen Zwei-Rezeptor-Modells wurde kürzlich von Gero (1983) untersucht. Da die Vorstellung einer gemeinsamen 56 kDa Bindungseinheit, die in Abwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP um eine 42 kDa Einheit erweitert werden muß, das Ergebnis gleich gut beschreibt, geben wir dieser einfacheren Möglichkeit den Vorzug.

In Analogie zu den oben erwähnten Antagonist- und Agonistformen des Opioidrezeptors liegt es nahe, die größere Struktur, die für die Opioidbindung in Ionen- und GTP-freiem Medium notwendig ist, als "-Ionen"-Form (98 kDa) zu bezeichnen, die Na^+ , Mg^{++} und GTP durch Abspaltung eines nicht näher identifizierten Makromoleküls in die "+Ionen"-Form (56 kDa) überführen. Die "-Ionenform" kann im Gegensatz zur "+Ionen"-Form nicht zwischen einem agonistischen bzw. antagonistischen Liganden unterscheiden.

Es ist von Interesse, diese Ergebnisse mit denen aus anderen Studien über die Struktur des Opioidrezeptors zu vergleichen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, variieren die für solubilisierte Opioidrezeptoren gemessenen Größen sehr stark und werden von vielen Faktoren beeinflusst. Im Zusammenhang mit den hier bestimmten Größenunterschieden zwischen der "+Ionen"- und "-Ionen"-Form sollen zwei Arbeiten erwähnt werden: so zeigten Puget et al. (1981), daß beim Solubilisieren des mit [^3H]DIPR bzw. [^3H]Etorphin markierten Komplexes bei der Dichtegradientenzentrifugation bei Verwendung des Agonisten (Etorphin) die radioaktive Markierung bei ca. 12 S lag, während der durch den Antagonisten (Diprenorphin) markierte Komplex einen breiteren Bereich von ca. 10-12 S einnahm. Interessanterweise verschob sich die Lage des Antagonistenkomplexes in Anwesenheit von Na^+ und von GTP auf 10 S, d.h. in Anwesenheit dieser beiden Modulatoren war eine deutliche Größenreduktion zu beobachten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine andere Arbeit von Ogawa et al. (1981). Die Sepharose-Gelfiltration eines [^3H]DADLE-markierten Komplexes ergab in dieser Studie eine Größe von ca. 240 kDa. Der analog mit [^3H]Naloxon markierte, solubilisierter Komplex wurde in mehreren Fraktionen aufgefunden. Die Hauptfraktionen entsprachen einer Größe von ca. 240 kDa. Eine beträchtliche Menge wurde allerdings auch bei 120 kDa gefunden. Durch Zugabe von Na^+ nahm die Menge der bei 120 kDa gefundenen Radioaktivität auf Kosten der größeren Fraktion zu. Diese Autoren gaben an, daß an dem 120 kDa Komplex Na^+ -Ionen gebunden vorliegen, und nahmen an, daß eine allosterische Modulation des Rezeptors durch Na^+ -Ionen zu einer Verminderung der Größe um etwa den Faktor 2 führe.

Diese beiden Arbeiten unterstützen unseren Befund einer kleineren Bindungsstelle für den Antagonisten in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP, auch wenn die dort bestimmten absoluten Werte sich deutlich von unserem Ergebnis unterscheiden; dies ist durch die Möglichkeit von Aggregation oder Rezeptor-Detergens-Interaktion bei solubilisierten Rezeptoren hinreichend erklärbar.

In einer neueren Arbeit solubilisierten Manekjee et al. (1985) mit Hilfe des nichtionischen Detergens Chaps den Opioidrezeptor und konnten bei Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen eine Hauptbande bei 96 kDa und zwei kleinere Einheiten bei 44 bzw. 35 kDa unterscheiden. Da die Opioidbindung an den solubilisierten Rezeptor GTP-empfindlich war, nahmen die Autoren eine Beteiligung der GTP-bindenden N_1 -Einheit an, und interpretierten die 96 kDa Einheit als Rezeptor, die kleineren Proteine als Untereinheiten des N_1 -Bindungsproteins.

Eine weitere auffallende Übereinstimmung zwischen unseren "Target Size Analysis"-Daten und früher bestimmten Größen findet sich in den mit Hilfe der Affinitätsmarkierung des Opioidrezeptors durchgeführten Arbeiten. Sowohl für den δ - (Klee et al., 1982), wie auch für den μ -Rezeptortyp (Newman und Barnard, 1984) wurde mit Hilfe dieser Methode für die kovalent markierte Polypeptidkette des Rezeptors eine Größe von 58 kDa bestimmt. Bei dieser Methode kann allerdings nicht entschieden werden, ob diese Struktur einem aktiven Rezeptor entspricht, oder ob für das Zustandekommen einer Bindung noch zusätzliche Einheiten notwendig sind. Diese Frage konnte nun mit Hilfe der Target Size Analysis beantwortet werden: während für den Antagonisten in Na^+ , Mg^{++} und GTP diese Struktur von 56 - 58 kDa zur Bindung bereits ausreicht, ist in ionenfreiem Puffer eine Bindung an diese Rezeptoreinheit ohne die Beteiligung einer zusätzlichen 42 kDa Einheit nicht möglich.

Über die Natur dieses zusätzlich benötigten Moleküls kann die Target Size Analysis prinzipiell keine Aussage machen. Einige Vorstellungen können aber von dem Modell der an das Enzym Adenylatzyklase gekoppelten Hormonrezeptoren abgeleitet werden (Rodbell, 1980; Ross und Gilman, 1980). Dieser Rezeptor-Effektorkomplex besteht aus wahrscheinlich 3 Untereinheiten: der Liganden-Bindungsstelle (R), die über ein nucleotidbindendes Protein (N) an die Adenylatzyklase (C) gekoppelt ist (Abb. 27).

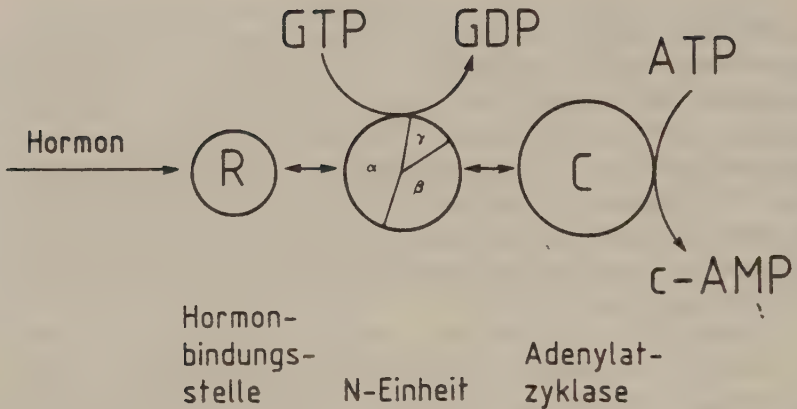


Abb. 27

Rezeptoren, deren Aktivierung zu einer Stimulation der Adenylatzyklase führt, sind an das stimulatorische N_s gekoppelt, andere, die wie der Opioidrezeptor einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylatzyklase ausüben, sind an die inhibitorische N-Einheit, N_i , (Jakobs et al., 1985) gekoppelt. Die N-Einheiten konnten isoliert werden, die N_i setzt sich aus mehreren Untereinheiten, α , β und γ zusammen, die eine molekulare Größe von 42, 35 bzw. 10 kDa aufweisen (Cordina et al., 1983). Die Aufgabe dieser regulatorischen N-Einheiten besteht einerseits in der Übertragung des Rezeptorstimulus auf die Adenylatzyklase, auf der anderen Seite vermitteln diese Einheiten den inhibitorischen Effekt des GTP auf die Bindung des Agonisten an den Rezeptor. Die Ergebnisse von Manekjee et al. (1985) lassen vermuten, daß die solubilisierten Rezeptoren - da sie ihre Empfindlichkeit gegenüber GTP auch nach dem Solubilisieren beibehalten - wahrscheinlich aus Rezeptor plus N_i bestehen: Es kann daraus auf eine hohe Affinität zwischen den beiden Einheiten (R und N) geschlossen werden. Zusätzlich berichtete Limbird (1981) nach Versuchen am β -adrenergen Rezeptorsystem, daß nur der Komplex zwischen der R und der N-Einheit hohe Affinität für den Agonisten aufweist. Durch Zugabe von GTP (bei stimulatorisch an die Adenylatzyklase gekoppelten Rezeptoren spielt

Na^+ keine Rolle, GTP alleine ist ausreichend) dissoziiert dieser R-N-Komplex und führt zu einem freien R-Molekül, das niedrige Affinität für den Agonisten aufweist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wregget und De Léan (1984) bei Untersuchungen am D_2 -Dopaminrezeptor: Sie zeigten, daß für die hochaffine Bindung außer dem Rezeptor noch eine weitere Membrankomponente (wahrscheinlich die nukleotidbindende Einheit N) notwendig ist. Auf Grund dieser Überlegungen, gestützt auch durch die überraschend gute Übereinstimmung der Größe der 42 kDa N_i - α -Untereinheit mit der postulierten zusätzlichen Einheit für eine Opioidbindung in ionenfreiem Milieu, können die mit der Target Size Analysis gemessenen Größen einmal als isolierte Rezeptoreinheit ($\text{R} = 56$ kDa), zum anderen als Rezeptor- αN_i -Komplex ($= 98$ kDa) interpretiert werden.

Eine alternative Interpretation, die auf Grund der gegebenen Fehlergrenze (15% nach Kempner und Schlegel, 1979) nicht sicher ausgeschlossen werden kann, wäre die Annahme, daß der Rezeptor R in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP als Monomer, im ionenfreien Medium hingegen als Dimer vorliegt (R-R). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, daß der isolierte Rezeptor der Größe 58 kDa stark zur Dimerbildung neigt (Simonds et al., 1985).

Die Interpretation der 98 kDa Einheit als R-N_i Komplex mag insofern paradox erscheinen, als die nukleotid-bindende Einheit (N) üblicherweise mit dem funktionalen Aspekt des Rezeptors in Verbindung gebracht wird, während unter der Bedingung, unter der hier dieser Komplex (R-N_i) angenommen wird (in Abwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP) kein Effekt auf die Adenylatzyklase meßbar ist (Blume et al., 1979). Eine Beteiligung der N_i Einheit an der Opioidbindung im ionenfreien Medium kann jedoch in anderen Versuchen gezeigt werden: so beeinflusst in Neuroblastoma x Glioma-Zellen das Pertussis-toxin (aus Bordetella Pertussis), dessen Wirkung als eine spezifische Inaktivierung der N_i beschrieben wird (Kurose et al., 1983), im Na^+ und GTP-freien Medium die Opioidbindung, sowohl von Agonisten (Hsia et al., 1984) als

auch vom partiellen Agonisten [^3H]Diprenorphin (Ott et al., 1986a). Daher ist die N-Einheit unter dieser Bedingung an der Bindung beteiligt.

Auch bei der Inaktivierung der Opioidbindung in ionen- und GTP-haltigem Puffer war kein Unterschied zwischen den verschiedenen Rezeptortypen zu beobachten. Dies läßt vermuten, daß alle drei Rezeptortypen gleichermaßen aufgebaut sind, d.h. daß sie aus einer ca. 56 kDa Bindungseinheit und einer ca. 42 kDa regulatorischen N-Einheit bestehen. Damit in Einklang steht auch die Tatsache, daß eine Erniedrigung der Agonistenbindung durch Na^+ , Mg^{++} und GTP ebenfalls bei allen drei Rezeptortypen zu beobachten ist (Pfeiffer et al., 1981b).

Da allerdings mehrere strukturell ähnliche N-Proteine in der Membran existieren (Sternweis und Robinson, 1984) und da außer bei dem Adenylatzyklasesystem wahrscheinlich auch bei anderen "second messenger"-Systemen (z.B. Inositolphosphatspaltung) eine Rolle spielen (Marayama und Ui, 1985), wäre es voreilig zu schließen, daß sowohl μ -, δ - als auch κ -Rezeptoren im zentralen Nervensystem an eine Inaktivierung der Adenylatzyklase gekoppelt seien.

4.5 Inaktivierungskurven für die Opioidagonistenbindung in Na^+ , Mg^{++} und GTP

Bei den bisher besprochenen Versuchen beruhte die Abnahme der Rezeptorbindung - wie Scatchardanalysen zeigten - ausschließlich auf einer Abnahme der Zahl der Bindungsstellen; die Affinität der Liganden zum Rezeptor blieb unverändert. Dies erlaubte eine eindeutige Bestimmung der molekularen Größe.

Bei den Inaktivierungskurven, wie sie für die reinen Opioidagonisten (DADLE + OXY) in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP erhalten werden, ergibt sich ein komplizierteres Bild. Hier liegt neben der Verminderung der Anzahl der Re-

zeptormoleküle zusätzlich eine Veränderung der Affinität der Liganden zum Rezeptor vor. Die genaue Untersuchung der Verhältnisse wird dadurch kompliziert, daß der Agonist unter diesen Bedingungen nicht an eine homogene Rezeptorpopulation gleicher Affinität bindet. In Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP wird die Bindung an den Rezeptor in wahrscheinlich drei Bindungskomponenten unterschiedlicher Affinitäten aufgespalten (Costa et al., 1985; Law et al., 1985). Da der Zusatz von Na^+ , Mg^{++} und GTP für die Übertragung eines Agonisten-effekts auf die Adenylatzyklase notwendig ist (Blume et al., 1979), wird das Auftreten der verschiedenen Bindungskomponenten unter dieser Bedingung gemeinhin als Ausdruck der Interaktion des Rezeptors mit den verschiedenen Untereinheiten des Rezeptor-Adenylatzyklase-Komplexes angesehen. Die Untersuchung der Agonistenbindungen ist daher unter diesen Bedingungen von besonderem Interesse, obwohl die Messung der spezifischen Bindung wegen der nur sehr niedrigen Affinität mit beträchtlichen Ungenauigkeiten einhergeht.

Phänomenologisch ist in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP eine Stimulierung der Rezeptorbindung durch Bestrahlung des Gewebes zu beobachten. Scatchardanalysen deuten darauf hin, daß dies nicht auf eine Erhöhung der Menge der Rezeptormoleküle zurückzuführen ist, sondern daß der relative Anteil der höher affinen Form durch Bestrahlung zunimmt. Da der Grundeffekt von ionisierenden Strahlen immer eine Zerstörung von molekularen Einheiten ist, muß als prinzipielle Erklärung dieses Phänomens die Zerstörung einer molekularen Einheit angenommen werden, deren Funktion darin besteht, die Bindung des Agonisten zum Rezeptor zu erniedrigen. Es handelt sich dabei wohl um eine Einheit, die den Na^+ , Mg^{++} und GTP-abhängigen Übergang des Rezeptors in eine (oder mehrere) niederaffine Form(en) begünstigt oder vermittelt. Wird diese Struktur durch Bestrahlung zerstört, so nimmt die Empfindlichkeit der Membranen gegenüber der Wirkung der Ionen und des GTP ab, der Rezeptor wird somit in einer höher affinen Form gehalten.

Über die Größe der für die verschiedenen Affinitäten

verantwortlichen molekularen Einheiten kann keine eindeutige Aussage gemacht werden. Da es sich bei dieser Stimulierung um eine Inhibierung einer Inhibierung handelt, ist die Steilheit und das Ausmaß der "Stimulierung" von der Stärke der vorherigen Inhibierung abhängig. Der maximale Effekt wurde hier bei Zugabe aller drei Modulatoren in maximaler Konzentration zu rohen Membranhomogenaten beobachtet. Es läßt sich zwar eine Steigung der ansteigenden Komponente bestimmen, dennoch wäre es eine unzulässige Überinterpretation der "Target Size Analysis", wenn auf diese Weise eine Molekülgröße berechnet würde. Hierzu müßte die Bindung in ihre einzelnen Komponenten zerlegt werden und für jede einzelne die Zu- bzw. Abnahme bestimmt werden. Dies stellt allerdings auf Grund der sehr geringen spezifischen Bindung der Agonisten unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein Problem dar: So kann mit Scatchardanalysen zwar die Existenz von zwei oder mehreren Affinitätskomponenten festgestellt werden, die Bestimmung der genauen Menge der Bindungsstellen ist allerdings nicht immer mit hinreichender Genauigkeit möglich. Und selbst die so erhaltenen Steigungen könnten nur unter gewissen Voraussetzungen als größenäquivalent interpretiert werden, da darüberhinaus eine gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Untereinheiten angenommen werden muß (siehe Methodenteil 2.3). Daher beschränken wir uns auf folgende gesicherte Aussagen:

- 1) Während es in Ionen- und GTP-freien Puffern keinen Unterschied zwischen dem die Agonisten und die Antagonisten bindenden Rezeptor gibt, läßt sich in Anwesenheit der Ionen und GTP ein deutlicher Unterschied im Inaktivierungsmuster erkennen.
- 2) Die verschieden affinen Bindungskomponenten des Agonisten in Na^+ -, Mg^{++} - und GTP-haltigem Milieu sind nicht auf einzelne unabhängige Rezeptormoleküle zurückzuführen. Sie sind ineinander überführbar und kommen durch Interaktion zwischen einer Na^+ -, Mg^{++} - und GTP-Effekt vermittelnden Einheit und dem Rezeptormolekül zustande.
- 3) Diese die inhibitorische Wirkung der Ionen und des GTP

vermittelnde molekulare Struktur ist in ihrer Gesamtheit stärker strahlenempfindlich als die den Liganden bindende Einheit, da bei einer Strahlendosis, bei der noch eine hinreichend bestimmbare Rezeptormenge erhalten ist, der Effekt der Ionen und des GTP bereits nicht mehr meßbar ist. Diese höhere Strahlenempfindlichkeit kann entweder a) auf einer deutlich größeren molekularen Struktur, oder b) auf einer nur geringen Menge im Vergleich zu den Rezeptormolekülen (Stoichiometrie nicht gleich 1) aber auch c) auf einer extremen Labilität gegenüber indirekten Effekten (z.B. bei einer exponierten SH-Gruppe) beruhen. Da es für keine dieser Möglichkeiten einen deutlichen Hinweis gibt, kann über diese molekulare Struktur zur Zeit nichts Genaueres ausgesagt werden. Zusätzliche Untersuchungen sind nötig, um diese Frage weiter zu klären.

Es läßt sich jedoch festhalten, daß für den Antagonisten (und auch partiellen Agonisten) in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP, d.h. im funktionalen Zustand des Rezeptors eine solche zusätzliche Einheit keine Rolle spielt. Diese Bindung findet nur an dem freien Rezeptormolekül R statt. Daher ist anzunehmen, daß diese molekulare Einheit, die die Affinität des Agonisten reduziert, ein Teil eines Effektorsystems darstellt. Ob sie mit einer der bekannten Einheiten (N_i , N_o , C) des Adenylatzyklasesystems identisch ist, läßt sich auf Grund dieser Ergebnisse noch nicht entscheiden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der "Target Size Analysis" zur Untersuchung der molekularen Größe der Opioidrezeptoren angewendet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Bei der Bestrahlung von lyophilisierten oder gefrorenen Gewebehomogenaten ergab sich jeweils eine zweiphasische Strahleninaktivierung der Opioidbindung. Der Anteil der "steilen" Komponente an der Gesamtbindungsaktivität war unabhängig von der Art des verwendeten Liganden, andererseits aber abhängig von der Gewebevorbereitung zur Bestrahlung. Ferner konnte für diese "steile" Komponente eine Beteiligung von indirekten, d.h. durch chemische Reaktionen ausgelösten Strahleneffekten nachgewiesen werden. Somit beruhen die beschriebenen Zweikomponentenkurven nicht auf unterschiedlich großen Rezeptortypen, sondern sie reflektieren eine außerordentliche Empfindlichkeit des Opioidrezeptors gegenüber indirekter Strahleninaktivierung. Dies läßt sich vermutlich auf einen Lipidanteil des Rezeptors zurückführen.

2. Mit der Betrachtung von gefrorenen Gewebeschnitten wurde eine Methode gefunden, bei der indirekte Strahleninaktivierungen weitgehend ausgeschaltet sind. Die so gewonnenen Inaktivierungskurven für die Opioidbindung zeigten einen monoexponentiellen Verlauf, wobei die Abnahme der Bindung rein auf einer Reduktion der Zahl intakter Rezeptoren-ohne Beeinflussung der Affinität- beruhte. Aus der Steigung dieser Inaktivierungskurven ließ sich die Größe der opioidbindenden Struktur berechnen. Diese wies unabhängig davon, ob die Bindung von Agonisten oder von Antagonisten untersucht wurde, eine Größe von ca. 98 kDa auf. Dies bedeutet, daß für die hochaffine Bindung der Opioide eine ca. 98 kDa große Struktur verantwortlich ist; dabei kann es sich um ein einzelnes Molekül handeln oder auch um mehrere

Untereinheiten, die zusammenwirken müssen, um die Opioidbindung zu ermöglichen.

3. In dieser Arbeit wurden keine unterschiedlichen Größen gefunden, wenn Liganden verwendet wurden, die gewisse Selektivität gegenüber den einzelnen Opioidrezeptortypen (μ , δ , κ) aufweisen. Im Gegensatz dazu steht ein Bericht von Lai et al. (1984), wonach die Untersuchung mit Hilfe des κ -Liganden Etorphin eine flachere Inaktivierungskurve, und damit eine kleinere Größe für diesen Rezeptortyp ergab. Da keiner der bekannten Opioidliganden tatsächlich nur mit einem Rezeptortyp interagiert, wurde der Frage einer Unterscheidung zwischen dem μ -, δ - und κ -Typ noch mit zwei weiteren Ansätzen nachgegangen: Einmal wurde die Methode der "sequentiellen Verdrängung" benutzt. Dabei werden alle drei Typen mit dem nichtselektiven [^3H]Diprenorphin markiert, das nacheinander vom δ - bzw. δ - und μ -Typ durch Zugabe von nichtmarkierten selektiven Liganden in relativ geringen (d.h. selektiven) Konzentrationen verdrängt wird. Die dann noch meßbare spezifische Bindung wird dem κ -Typ zugeordnet. Zum anderen wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der Gewebearten untersucht wurden, die unterschiedliche Mengen der einzelnen Rezeptortypen enthalten: Meerschweinchengehirne, die im Vergleich zur Ratte einen höheren κ -Anteil aufweisen, Froschgehirne, deren Opioidrezeptoren zu ca. 80% aus dem κ -Typ bestehen, Schweinehypothalamus und -thalamus, eine Gehirnregion, die besonders reich am μ -Typ ist, sowie Neuroblastoma x Glioma Hybridzellen, die ausschließlich Rezeptoren des δ - Typs enthalten. Mit diesen drei methodischen Ansätzen (selektive Liganden, sequentielle Verdrängung eines nichtselektiven Liganden sowie Gewebearten verschiedener Rezeptortypendominanz) wurde kein Hinweis auf eine unterschiedliche Größe der untersuchten Rezeptortypen gefunden. Dies schließt allerdings nicht aus, daß es sich bei diesen Rezeptortypen um voneinander unabhängige, verschiedene Moleküle handelt, die "zufällig" gleiche Größe aufweisen. Da allerdings auch eine gleiche Empfindlichkeit der Rezeptortypen gegenüber indirekter

Stahleninaktivierung zu beobachten war (siehe 1.), läßt sich ein ähnlicher Aufbau der verschiedenen Typen vermuten.

4. Opioidrezeptoren können in verschiedenen Zustandsformen vorliegen. Die bisher beschriebenen Ergebnisse bezogen sich auf den hochaffinen Rezeptorzustand, wie er in Abwesenheit von Na^+ - und Mg^{++} -Ionen und von GTP vorliegt. Der Zustand nach Zugabe dieser allosterischen Modulatoren wird als sog. "funktionaler" Rezeptorzustand bezeichnet, da nur in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP in vitro ein rezeptorvermittelter Effekt gemessen werden kann. Aus der Strahleninaktivierung der Bindung von Antagonisten (und partiellen Agonisten) unter diesen "funktionalen" Bedingungen berechnete sich eine um etwa 40% kleinere Größe (56 kDa), als für den hochaffinen Rezeptorzustand in Abwesenheit der Bindungsmodulatoren (98 kDa). Die einfachste Erklärung dieses Ergebnisses ist, daß in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP die Liganden an eine 56 kDa große Bindungseinheit binden, während in Abwesenheit dieser Modulatoren, eine zusätzliche molekulare Einheit von ca. 40 kDa hinzutreten muß, um die hochaffine Opioidbindung zu gewährleisten. Über die Natur dieses 40 kDa Moleküls kann die "Target Size Analysis" keine Aussage machen, allerdings liegt es nahe, an die regulatorischen Einheiten (N_i , N_o) der Membran zu denken. Die α -Untereinheiten dieser (nukleotidbindenden) N-Proteine, für die eine Interaktion mit den opioidbindenden Einheiten angenommen werden darf, weisen eine molekulare Größe von ca. 40 kDa auf. Da außerdem eine Beteiligung der N-Einheit an der hochaffinen Bindung in Abwesenheit von Bindungsmodulatoren auch für andere Rezeptoren postuliert wurde, ist es plausibel anzunehmen, daß die 98 kDa Einheit aus der 56 kDa bindenden Einheit R und der α -Untereinheit eines N-Proteins besteht.

5. Im Gegensatz zu Antagonisten wurden für reine Agonisten in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{++} und GTP zweiphasische Inaktivierungskurven erhalten, wobei niedrige Bestrahlungsdosen erst zu einer Aktivierung, d.h. einem Anstieg der spezifi-

schen Bindung führten. Die Kurve ging ab ca. 100-150 kGy in eine scheinbar monoexponentielle Inaktivierung über. Es handelt sich bei dieser Stimulierung der Agonistenbindung nicht um eine Erhöhung der verfügbaren Rezeptormenge, sondern um eine Erhöhung der Affinität der Liganden zum Rezeptor. Die Wirkung der Modulatoren Na^+ , Mg^{++} und GTP, die die Affinität des Agonisten erniedrigen, wird durch Bestrahlung reduziert. Dies beruht wahrscheinlich auf einer Strahleninaktivierung der molekularen Einheit, die für die Vermittlung des Na^+ , Mg^{++} und GTP-Effekts notwendig ist. Dadurch wird das Rezeptormolekül weniger sensitiv gegenüber der Wirkung dieser Modulatoren. Erst wenn ihre Wirkung völlig aufgehoben ist (nach ca. 100-150 kGy), wird die Strahlenzerstörung der Rezeptoreinheit selbst sichtbar. Aus solchen komplexen Inaktivierungsmustern ist keine einfache Berechnung von molekularen Größen möglich, da es sich um miteinander interagierende Struktureinheiten handelt. Es ist jedoch interessant festzustellen, daß die Bindung des reinen Agonisten an den Rezeptor im funktionalen Zustand durch eine weitere Membrankomponente beeinflusst wird, und daß andererseits die Bindung der Antagonisten (und partiellen Agonisten) unter dieser Bedingung nur durch das freie Rezeptormolekül R (56 kDa) determiniert wird.

6. Literaturverzeichnis

- Abood, L.G., und Hoss, W. "Stereospecific morphine absorption to phosphatidyl serine and other membranous components of brain" *J. Pharmacol.* 32 (1975) 66-75
- Abood, L.G., und Takeda, F. "Enhancement of stereospecific opiate binding to neuronal membranes by phosphatidylserine" *Europ. J. Pharmacol.* 39 (1976) 71-74
- Agrawal, D.K., Grover, A.K., Daniel, E.E., und Jung, C.Y. "Determination of the molecular size of alpha-1 und alpha-2 adrenoceptors in rat mesenteric artery by radiation inactivation" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236 (1986) 748-752
- Alexander, P. "Protection of macromolecules in vitro against damage by ionizing radiations" in: *Radiation Protection and Recovery* (A. Hollaender, Hrsg.) Pergamon Press, Oxford (1961) 3-44
- Ariens, E.J. "Receptors from fiction to fact" *Trends Pharmacol. Sci.* 1 (1979) 11-15
- Attali, B., Gouarderes, C., Mazarguil, H., Audigier, Y., und Cros, J. "Evidence for multiple "kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea-pig lumbo-sacral spinal cord" *Neuropeptides* 3 (1982) 53-64
- Barnard, E.A., und Demoliou-Mason, C. "Molecular Properties of Opioid Receptor" *Brit. Med. Bullet.* 39 (1983) 37-45
- Beckett, A.H., und Casy, A.F. "Synthetic analgesics: stereochemical considerations" *J. Pharm. Pharmacol.* 6 (1954) 986-1001
- Bidlack, J.M., Abood, L.G., Osei-Gyimah, P., und Archer, S. "Purification of the opiate receptor from rat brain" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 636-639
- Bielski, B., und Gebicki, J.M. "Application of radiation biochemistry to biology" in: *Free Radicals in Biology*, Vol. III (W.A. Pryor, Hrsg.) Academic Press, New York (1977) 1-51
- Bishayee, S., und Balasubramanian, A.S. "Lipid peroxide formation in rat brain" *J. Neurochem.* 18 (1971) 909-920
- Blume, A.J. "Interaction of ligands with the opiate receptors of brain membranes: Regulation by ions and nucleotides" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 1713-1717
- Blume, A.J., Lichtshtein, D., und Boone, G. "Coupling of the opiate receptors to adenylate cyclase: Requirement for Na⁺ and GTP" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 5626-5630

- Bowen, W.D., Gentleman, S., Herkenham, M., und Pert, C.B. .
"Interconverting mu and delta forms of the opiate receptor in rat striatal patches" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 4818-4822
- Braams, R., Hutchinson, F., und Ray, D. "Changes in the Sensitivity of Enzymes in the Dry State to Radiation", Nature 183 (1958) 1056-1058
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R., Birdsall, N.J.M., und Hulme, E.C. "C-fragment of lipotropin has high affinity for brain opiate receptors" Nature 260 (1976) 793-795
- Braenden, O.J., Eddy, N.B., und Halbach, H. "Synthetic substances with morphine-like effect; relationship between chemical structure and analgesic action" Bull. WHO 13 (1955) 937-998
- Broccardo, V., Munson, P.J., und Rodbard, D. EXPFIT, (1984) noch unveröffentlicht
- Butler, J.A.V., und Robins, A.B. "Effects of oxygen on the inactivation of enzymes by ionizing radiations" Radiat. Res. 17 (1962) 62-73
- Chang, K.J., und Cuatrecasas, P. "Multiple Opiate Receptors" J. Biol. Chem. 254 (1979) 2610-2618
- Chang, K.J., Cooper, B.R., Hazum, E., und Cuatrecasas, P. "Multiple Opiate Receptors: Different Distribution in the Brain and Differential Binding of Opiates and Opioid Peptides" Mol. Pharmacol. 16 (1979) 91-104
- Chang, K.J., Miller, R.J., und Cuatrecasas, P. "Interaction of enkephaline with opiate receptors in intact cultured cells" Mol. Pharmacol. 14 (1978) 961-970
- Chang, L.R., Barnard, E.A., Lo, M.S., und Dolly, J.O. "Molecular Size of the Benzodiazepine Receptors and the Interacting GABA Receptors in the Membrane are Identical" FEBS Lett. 126 (1981) 309-312
- Chavkin, C., und Goldstein, A. "Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: Structure-activity relationship" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 6543-6547
- Chavkin, C., James, I.F., und Goldstein, A. "Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor" Science 215 (1982) 413-415
- Childers, S.R., und Snyder, S.H. "Differential Regulation by Guanine Nucleotides of Opiate Agonist and Antagonist Receptor Interactions" J. Neurochem. 34 (1980) 583-593

- Chow, T., und Zukin, S. "Solubilization and Preliminary Characterization of μ and κ Opiate Receptor Subtypes from Rat Brain" *Mol. Pharmacol.* 24 (1983) 203-212
- Codina, I., Hildebrandt, J.D., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R.D., und Manclark, C.R. "Pertussis toxin substrate, the putative N_i component of adenylate cyclase is an alpha, beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4267-4280
- Costa, T., Wüster, M., Gramsch, C., und Herz, A. "Multiple states of opioid receptors may modulated adenylate cyclase in intact neuroblastoma x glioma hybrid cells" *Mol. Pharmacol.* 28 (1985) 146-154
- Cox, B.M., Goldstein, A., Choh, H.L. "Opioid activity of a peptide, beta-lipotropin (61-91), derived from beta-lipotropin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1821-1823
- Crause, P., Boer, R., und Fahrenholz, F. "Determination of the functional molecular size of vasopressin isoreceptors" *FEBS Lett.* 175 (1984) 383-386
- Creese, I., Snyder, S.H. "Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea pig intestine" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194 (1975) 205-219
- Crowther, J.A. "Some Considerations relative to the Action of X-Rays on Tissue Cells" *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 96 (1924) 207-211
- Członkowski, A., Costa, T., Przewłocki, R., Pasi, A., und Herz, A. "Opiate receptor binding in human spinal cord" *Brain Res.* 267 (1983) 392-396
- Dale, W.M. "Effect of X-rays on aqueous solutions of biologically active compounds" *Brit. J. Radiol.* 16 (1943) 171-172
- Dertinger, H., und Jung, H. "Molekulare Strahlenbiologie" *Heidelberger Taschenbücher*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1969)
- Dessauer, F. "Über einige Wirkungen von Strahlen" *Z. Physik* 12 (1922) 38-47
- Doble, A., und Iversen, L.L. "Molecular size of the benzodiazepine receptor in rat brain in situ: evidence for a functional dimer" *Nature* 295 (1982) 522-423
- Dole, V.P., Cuatrecasas, P., und Goldstein, A. "Biochemical identification of receptors: Criteria for receptors" in *Opiate receptor mechanisms* (S.H. Snyder und S. Matthysse, Hrsg.) *Neurosc. Res. Prog. Bull.* 13 (1974) 24-26

- Dornay, M., and Simantov, R. "Opiate receptors from different tissue sources: Solubilisation and characterization" *J. Neurochem.* 38 (1982) 1524-1531
- Dunlap, C.E., Leslie, F.M., Rado, M., and Cox, B.M. "Ascorbate Destruction of Opiate Stereospecific Binding in Guinea Pig Brain Homogenate", *Mol. Pharmacol.* 16, (1979) 105-119
- Ehrlich, P. "Chemotherapeutics: scientific principles, methods and results" *Lancet* 2 (1913) 445-451
- Ferry, D.R., Goll, A., and Glossmann, H. "Calcium channels: evidence of oligomeric nature by target size analysis" *EMBO J.* 2 (1983a) 1729-1732
- Ferry, D.R., Goll, A., and Glossmann, H. "Putative calcium channel molecular weight determination by target size analysis" *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 323 (1983b) 292-297
- Fricke, H. "The chemical-physical foundation for the biological effects of X-rays" *Cold Spring Harbour Symp.* 2 (1934) 241-247
- Friedberg, F. "Effect of irradiation on some lyophilized proteins" *Radiat. Res.* 38 (1969) 34-42
- Garrison, W.M., Layko, M.E., Weeks, B.M., Sokol, H.A., and Bennett-Corniea, W. "Chemical evidence for main-chain scission as a major decomposition mode in the radiolysis of solid peptides" *J. Phys. Chem.* 71 (1967) 1546-1547
- Gates, M., and Tschudi, G. "The synthesis of morphine" *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 1380-1393
- Gero, A. "One- and Two-Receptor Models of Opioid Drug Action" *Life Sci.* 36 (1985) 1021-1024
- Gilbert, P.E., and Martin, W.R. "The effect of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198 (1976) 66-82
- Gillan, M.G.C., and Kosterlitz, H.W. "Spectrum of the mu-, delta- and kappa-binding sites in homogenates of rat brain" *Brit. J. Pharmacol.* 77 (1982) 461-469
- Gioannini, T., Foucaud, B., Hiller, J.M., Hatten, M.E., and Simon, E.J. "Lectine binding of solubilized opiate receptors: Evidence of their glycoprotein nature" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 105 (1982) 1128-1134

- Glasel, J.A., und Venn, R.J. "Opiate and Opioid Peptide Binding Measurements in Vertebrate CNS" in: Current Methods in Cellular Neurobiology. Vol II, Biochemical Techniques (L.J. Barker und J.F. McKelvy, Hrsg.) Wiley and Sons, New York (1984) 185-245
- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I. Hunkapiller, M., und Hood, L., "Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequences of the biologically active hepta-decapeptide" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 7219-7223
- Goldstein, A., Lowney, L.I., und Pal, B.K., "Stereospecific and Nonspecific Interaction of the Morphine Congener Levorphanol in Subcellular Fractions of the Mouse Brain" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971) 1742-1747
- Goodman, R.R., Snyder, S.H., Kuhar, M.J. und Young, W.S. "Differentiation of mu and delta opiate receptor localisation by light microscopic autoradiography" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 6239-6243
- Gulland, J.M., und Robinson, R. "The constitution of codeine and thebaine" Memoires of the Proceedings of the Manchester Literary and Philosophical Society 1924-1935, 69 (1935) 79-86
- Hamprecht, B. "Neuronenmodelle" Angew. Chem. 88 (1976) 211-223
- Hamprecht, B. "Structural, electrophysiological, biochemical and pharmacological properties of neuroblastoma x glioma cell hybrids in cell culture" Int. Rev. Cytol. 49 (1977) 99-170
- Harmon, J.T., Hedo, J.A., und Kahn, C.R. "Characterisation of a Membrane Regulator of Insulin Receptor Affinity", J. Biol. Chem. 258 (1983) 6875-6881
- Harmon, L.T., und Jamieson, G.A. "Thrombin binds to a high affinity 900000 dalton site on human platelets" Biochemistry 24 (1985) 58-64
- Helenius, A., und Simons, K. "Solubilisation of membranes by detergents" Biochim. Biophys. Acta 415 (1975) 29-79
- Herz, A. "Die Rolle multipler Rezeptoren und ihrer Liganden bei der Schmerzmodulation" Arzneim. Forsch. 34 (1984a) 1080-1083
- Herz, A. "Multiple endorphines as natural ligands of multiple opioid receptors" in: Central and peripheral endorphins: basic and clinical aspects (E.E. Miller und A.R. Genazzani, Hrsg.), Raven Press, New York (1984b) 43-52

- Höllt, V. "Multiple endogenous opioid peptides" Trends Neurosci. 6 (1983) 24-26
- Holweck, F. "Mésure des dimensions élémentaire des virus par la methode d'ultramicrometry statistique" C.R. Acad. Sci. 207 (1938) 380
- Howells, R.D., Gioannini, T.L., Hiller, J.M., und Simon, E. J. "Solubilisation and Characterisation of Active Opiate Binding Sites from Mammalian Brain" J. Pharmacol. Exp. Ther. 222 (1982) 629-634
- Hsia, J.A., Moss, J., Hewlett, E.L., und Vaughan, M. "ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effect on inhibitory agonist binding" J. Biol. Chem. 259 (1984) 1086-1090
- Hug, O. und Kellerer, A.M. "Stochastik der Strahlenwirkungen" Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1966)
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A. Morgan, B.A., Morris, H.R. "Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity" Nature 258 (1975) 73-92
- Hutchinson, F., und Pollard, E. "Target theory and irradiation effects of biological molecules" in: Mechanism in radiology" (M. Errera, und A. Forssberg, Hrsg.) Vol. 1 New York Acad. Press (1961) 73-92
- Hutchinson, F., und Watts, W. "The effect of oxygen and some other gases on the radiation sensitivity of dry tryptophan" Radiat. Res. 14 (1961) 803-812
- Itzhak, Y., Hiller, J.M., und Simon, E.J. "Solubilization and characterization of mu, delta and kappa opioid binding sites from guinea pig brain: Physical separation of kappa receptors" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 4217-4221
- Jacob, K.H., Aktories, K., Minuth, M., und Schultz, G. "Inhibition of adenylate cyclase" Adv. in Cycl. Nucl. and Prot. Phosphor. Res. 19 (D.M.F. Cooper und K.B. Seaman, Hrsg.) Raven Press, New York (1985) 137-150
- James, T.F., Chavkin, C., und Goldstein, A. "Selectivity of dynorphin for kappa opioid receptors" Life Sci. 31 (1982) 1331-1334
- Jarvis, S.M., Young, J.D., und Ellory, J.C. "Nucleoside transport in human erythrocytes; Apparent molecular weight of the nitrobenzylthioinosine-binding complex estimated by radiation-inactivation analysis", Biochem. j. 190 (1980) 373-376

- Jung, C.Y. "Molecular Weight Determination by Radiation Inactivation" in: Molecular and Chemical Characterization of Membrane Receptors (Venter, J.C., und Harrison, L.C. Hrsg.) Alan R. Liss, Inc., New York (1984) 193-208
- Kadikani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S. "Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor" *Nature* 298 (1982) 245-249
- Kempner, E.S., und Haigler, H.T. "The Influence of Low Temperature on the Radiation Sensitivity of Enzymes" *J. Biol. Chem.* 157 (1982) 13297-13299
- Kempner, E.S., und Miller, L.H. "Radiation inactivation of glutamate dehydrogenase hexamer: lack of energy transfer between subunits" *Science* 222 (1983) 586-589
- Kempner, E.S., und Schlegel, W. "Size Determination by Radiation Inactivation" *Anal. Biochem.* 92 (1979) 2-10
- Kempner, G.R., und Macey, R.I. "Membrane Enzyme Systems Molecular Size Determinations by Radiation Inactivation" *Biochim. Biophys. Acta* 163 (1968) 188-203
- Kincaid, R.L., Kempner, E., Manganiello, V.C., Osborne, J.C., und Vaughan, M. "Calmodulin-activated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Brain; Relationship of Subunit Structure to Activity assessed by Radiation Inactivation" *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 11351-11355
- Klee, W.A., und Nirenberg, M. "A neuroblastoma x glioma hybrid cell line with morphine receptors" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3474-3477
- Klee, W.A., Simonds, W.F., Sweats, F.W., Burke, T.R., Jacobson, A.E., und Rice, K.C. "Identification of a Mr 58000 glycoprotein subunit of the opiate receptor" *FEBS Lett.* 150 (1982) 125-128
- Kosterlitz, H.W., Paterson, S.J., und Robson, L.E. "Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain" *Brit. J. Pharmacol.* 71 (1981) 939-949
- Kuhar, M.J., Pert, C.B., und Snyder, S.H. "Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain." *Nature* 245 (1973) 447-450
- Kurose, H., Katada, T., Amano, T., und Ui, M. "Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells" *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 4870-4873

- Kuschinsky, G. und Lüllmann, H., unter Mitwirkung von Peters T. "Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie" 8. überarbeitete Auflage (1978) Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Lai, F.A., Newman, E.L., Peers, E., und Barnard, E.A. "Size of Opioid Receptor Types in Rat Brain Membranes" *Europ. J. Pharm.* 103 (1984) 349-354
- Langley, J.N. "On the physiology of the salivary secretion. Part II. On the mutual antagonism of atropin and pilocarpin, having especially reference to their relations in the submaxillary gland of the cat" *J. Physiol.* 1 (1878) 339-369
- Laurent, A. "Sur la composition des alcalis organiques et de quelques combinaisons azotees" *Ann. Chim. Phys.* 19 (1847) 359-377
- Law, P.Y., Hom, D.S., und Loh, H.H. "Multiple affinity states of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG 108-15 hybrid cells" *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3561-3569
- Law, P.Y., Fischer, G., Loh, H.H., und Herz, A. "Inhibition of specific opiate binding to synaptic membrane by cerebroside sulfatase" *Biochem. Pharmacol.* 28 (1979) 2557-2562
- Law, P.Y., Wu, J., Koehler, J.E., und Loh, H.H. "Demonstration and Characterization of Opiate Inhibition of Striatal Adenylate Cyclase" *J. Neurochem.* 36 (1981) 1834-1846
- Lea, D. "Action of Radiation on Living Cells" Cambridge University Press (1946)
- Lee, N.M., und Smith, A.P. "A Protein-Lipid Model of the Opiate Receptor" *Life Sci.* 26 (1980) 1459-1464
- Leslie, F.M., und Kosterlitz, H.W. "Comparison of 3 H-methionine-enkephalin, 3 H-naltrexone and 3 H-dihydromorphine in the mouse vas deferens and brain of guinea pig" *Eur. J. Pharmacol.* 56 (1979) 379-383
- Levinson, S.R., und Ellory, J.C. "The molecular form of acetylcholinesterase as determined by irradiation inactivation" *Biochem. J.* 137 (1974) 123-125
- Limbird, L.E. "Activation and attenuation of the adenylate cyclase. The role of the GTP-binding proteins as macromolecular messengers in the receptor-cyclase coupling" *Biochem. J.* 195 (1981) 1-3

- Lo, M.M.S., Barnard, E.A., und Dolly, J.O. "Size of Acetylcholine Receptors in Membrane. An improved Version of the Radiation Inactivation Method" *Biochemistry* 21 (1982) 2210-2217
- Loh, H.H., Cho, T.M., Wu, Y.C., und Way, E.L. "Stereospecific binding of narcotics to brain cerebroside" *Life Sci.* 14 (1974) 2231-2245
- Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J., und Kosterlitz, H.W. "Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors" *Nature* 267 (1977) 495-499
- Lucas, A.C., und Kreutzberg, G.W. "Regulation of Acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures. - 1. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin" *Neuroscience* 14 (1985) 349-360
- Lux, B. "Modulation akuter und chronischer Opioidwirkungen im peripheren Nervengewebe durch bakterielle Neurotoxine" Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1986
- Madden, J.S. "Opioids and general sedatives" in: A guide to alcohol and drug dependence (J.S. Madden, Hrsg.) J. Wright & Sons, Bristol (1979) 134-164
- Magnan, J., Paterson, S.J., Tavani, A., und Kosterlitz, H.W. "The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist and antagonist properties" *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 319 (1982) 197-205
- Maneckjee, R., Zukin, R.S., Archer, S., Michael, J., und Osei-Gyimah, P. "Purification and characterization of the mu opiate receptor from rat brain using affinity chromatography" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 594-598
- Marayama, T., und Ui, M. "Receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase and stimulation of arachidonic acid release in 3T3 fibroblasts" *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 7226-7233
- Marshall, M., Holt, P.D., Gibson, J.A.B. "Physical parameters of radiation determined from the inactivation of ribonuclease" *Int. J. Radiat. Biol.* 18 (1970) 139-146
- Martin, B.R. "The Analysis of Interactions between Hormone Receptors and Adenylate Cyclase by Target Size Determination Using Irradiation Inactivation" in: *Current Topics in Membranes and Transport*, Vol. 18, Academic Press, Inc. (1983) 233-254
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huler, R.E., und Gilbert, P.E. "The effect of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197 (1976) 517-532

- Maurer, R. "Multiplicity of opiate receptors in different species" *Neurosci. Lett.* 30 (1982) 303-307
- Massoulie, J. "The polymorphism of cholinesterase and its physiological significance" *Trends Biol. Sci.* 5 (1980) 160-164
- McLowhan, R.W., Ellory, J.C., und Dawson, G. "Molecular Size of Opiate (Enkephalin) Receptors in Neuroblastoma-Glioma Hybrid Cells as Determined by Radiation Inactivation Analysis" *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 2102-2105
- Menzel, D.B. "The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (nitrogen and ozone)" in: *Free Radicals in Biology*, Vol. II (W.A. Pryor, Hrsg.) Acad. Press, New York (1976) 181-200
- Millan, M.J., und Herz, A. "The endocrinology of the opioids" *Int. Rev. Neurobiol.* 26 (1985) 1-84
- Munson, P.J., und Rodbard, D. "Ligand: A Versatile Computerized Approach for Characterization of Ligand-Binding Systems" *Anal. Biochem.* 107 (1980) 220-239
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A. C.Y., Cohen, S.N., und Numa, S. "Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor" *Nature* 278 (1979) 423-427
- Newman, E.L., und Barnard, E.A. "Identification of an Opioid Receptor Subunit Carrying the mu Binding Site" *Biochemistry* 23 (1984) 5385-5389
- Nishino, N., und Tanaka, C. "Target size analysis of serotonin 5HT₁ and 5-HT₂ receptors in the bovine brain membranes" *Life Sci.* 37 (1985) 1167-1174
- Nielson, M., und Braestrup, C. "The Molecular Target Size of Brain TBPS Binding Sites" *Europ. J. Pharm.* 96 (1983) 321-322
- Nielson, M., Honore, T., und Braestrup, C. "Radiation inactivation of brain (35S)-t-butylbicyclopheosphorothionate binding sites reveals complicated molecular arrangements of the GABA/benzodiazepine receptor chloride channel complex" *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 3633-3642
- Nielson, M., und Klimek, V., und Hyttel, J. "Distinct target size of dopamine D1 and D2 receptors in rat striatum" *Life Sci.* 35 (1984) 325-332
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., und Numa, S. "Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal proenkephalin" *Nature* 295 (1982) 202-206

- Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Nukina, I., und Ofuji, T. "Differentiation of agonist conformation and antagonist conformation in multiple opioid receptors" *Neurosci. Lett.* 27 (1981) 205-209
- Oliver, R., und Shepstone, B.J. "Some practical considerations in determining the parameters for multi-target and multi-hit survival curves". *Phys. Med. Biol.* 9 (1964) 167-175
- Ott, S., Costa, T., und Herz, A. "Effects of sodium and GTP on the kinetics of [3 H]diprenorphin binding in NG 108-15 cell membranes" *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* (1986a) im Druck.
- Ott, S., Costa, T., Hietel, B., Schlegel, W., und Wüster, M. "Molecular size of multiple opioid receptors" *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 324 (1983) 160-164
- Ott, S., Costa, T., Wüster, M., Hietel, B., und Herz, A. "Target size analysis of opioid receptors. No difference between receptor types, but discrimination between two receptor states" *Eur. J. Biochem.* 155 (1986b) 621-630.
- Paul, S.M., Kempner, E.S., und Skolnick, P. "In situ molecular weight determination of brain and peripheral benzodiazepine binding sites" *Eur. J. Pharmacol.* 76 (1981) 465-466
- Pasternak, G.W. "Multiple mu opiate receptors: biochemical and pharmacological evidence for multiplicity" *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 361-364
- Pasternak, G.W., Snowman, A.D., und Snyder, S.H. "Selective enhancement of 3 H-opiate agonist binding by divalent cations" *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 735-744
- Pasternak, G.W., und Snyder, S.H. "Opiate Receptor Binding: Effects of Enzymatic Treatments" *Mol. Pharmacol.* 10 (1974) 183-193
- Pasternak, G.W., und Snyder, S.H. "Opiate Receptor Binding: Enzymatic Treatments that discriminate between Agonist and Antagonist Interaction" *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 478-484
- Pert, C.B., Pasternak, G., und Snyder, S.H. "Opiate Agonists and Antagonists Discriminated by Receptor Binding in Brain" *Science* 182 (1973) 1359-1361
- Pert, C.B., und Snyder, S.H. "Opiate Receptor: Demonstration in nervous tissue" *Science* 179 (1973a) 1011-1014

- Pert, C.B., und Snyder, S.H. "Properties of Opiate-receptor Binding in Rat Brain" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973b) 2243-2247
- Peterson, G.L. "Determination of total protein" in: Methods in Enzymology, Vol. 91: Enzyme Structure (C.H.W. Hirs und S.N. Timsheff, Hrsg.) Academic Press, New York (1983) 95-119
- Pfeiffer, A., und Herz, A. "Discrimination of three opiate receptor binding sites with the use of a computerized curve-fitting technique" Mol. Pharmacol. 21 (1982) 266-271
- Pfeiffer, A., Pasi, A., Mehraein, P., und Herz, A. "A sub-classification of kappa-sites im human brain by use of dynorphin 1-17" Neuropeptides 2 (1981a) 89-97
- Pfeiffer, A., Pasi, A., Mehraein, P., und Herz, A. "Opiate receptor binding in human brain" Brain Res. 248 (1982) 87-96
- Pfeiffer, A., Sadée, W., und Herz, A. "Differential regulation of the mu, delta, and kappa opiate receptor subtypes by guanyl nucleotides and metal ions" J. Neurosci. 2 (1981b) 912-917
- Pohl, J. "Über das N-allylnorcodein, einen Antagonisten des Morphins" Zeitschr. f. Exp. Path. u. Ther. 17 (1915) 370-382
- Pollard, E.C., Guild, W.R., Hutchinson, F., und Setlow, R.B. "The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens" in: Progress in Biophysics (Butler, J.A.V., und Randell, J.T., Hrsg.) Vol. 5 (1955) 72-108
- Portoghese, P.S. "A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors" J. Med. Chem. 8 (1965) 609-619
- Portoghese, P.S., Larson, D.L., Jiang, J.B., Caruso, T.P., und Takemori, A.E. "Synthesis and pharmacological characterization of an alkylating analogue (chlornaltrexamine) of naloxone with ultralong-lasting narcotic antagonist properties" J. Med. Chem. 22 (1979) 168-173
- Puget, A., Jaurac, P., Zadac, J.M., and Meunier, J.M. "Opiate Receptors in the Rat Brain: Specific Labelling of Multiple Membrane Components with ³H-Etorphine" Mol. Pharmacol. 20 (1981) 263-268
- Regulla, D.F., und Deffner, U. "Dosimetry by ESR spektroskopie of alaine" Int. J. A 1. Radiat. Isot. 22 (1982) 1101-1114

- Rice, K.C., Jacobson, A.E., Burke, T.R.Jr., Bajwa, B.S., Streaty, R.A., und Klee, W.A. "Irreversible ligands with high selectivity toward mu and delta receptors" *Science* 220 (1983) 314-316
- Rodbell, M. "The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction". *Nature* 284 (1980) 17-21
- Ross, E.M., und Gilman, A.G. "Biochemical Properties of Hormone-Sensitive Adenylate Cyclase". *Ann. Rev. Biochem.* 49 (1980) 533-563
- Roth, J. "Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies in vitro". *Metabolism* 22 (1973) 1059-1073
- Rothman, R.B., und Westfall, T.C. "Allosteric coupling between morphine and enkephaline receptor in vitro". *Mol. Pharmacol.* 21 (1982) 554-557
- Rothman, R.B., Bowen, W.D., Bykov, V., Schumacher, V.K., Pert, C.B., Jacobson, A.E., Burke, T.R.Jr., und Rice, K.C. "Preparation of rat brain membranes greatly enriched with either type-I-delta or type-II-delta opiate binding sites using direct alkylating agents. Evidence for a two-site allosteric model" *Neuropeptides* 4 (1984) 201-215
- Scatchard, G. "The attraction of proteins for small molecules and ions" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660-674
- Schlegel, W. "Structure function relations for cell surface receptors and adenylate cyclase. Studies using target size analysis of irradiation inactivation" *J. Receptor Res.* 3 (1983) 330-357
- Schmauss, C., und Yaksh, T.L. "In vivo studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta, and kappa receptors with visceral, chemical, and cutaneous thermal stimuli in rat" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228 (1984) 1-12
- Schubert, J., und Sanders, E.B. "Cytotoxic radiolysis products of irradiated alfa, beta unsaturated carbonyl sugars as the carbohydrates" *Nature New. Biol.* 233 (1971) 199-203
- Schulz, R., Fraase, E., Wüster, M., und Herz, A. "Selective receptors for beta-endorphine on the rat vas deferens" *Life Sci.* 24 (1979) 843-850
- Schulz, R., Wüster, M., und Herz, A. "Pharmacological characterization of the epsilon receptor" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216 (1981a) 604-606

- Schulz, R., Wüster, M., Rubini, P., und Herz, A. "Functional opiate receptors in the guinea pig ileum: their differentiation by means of selective tolerance development" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219 (1981b) 547-550
- Setlow, R. und Doyle, B. "The effect of temperature on the direct action of ionizing radiation of catalase" *Arch. Biochem. Biophys.* 46 (1953) 46-52
- Sharma, S.K., Nirenberg, M., und Klee, W.A. "Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 590-594
- Simantow, R., Snowman, A.M., und Snyder, S.H. "Temperature and ionic influence on opiate receptor binding" *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 977-986
- Simon, E.J. und Groth, J. "Kinetics of Opiate Receptor Inactivation by Sulfhydryl Reagents: Evidence for Conformational Change in the Presence of Sodium Ions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2404-2407
- Simon, E.J., und Hiller, J.M. "The opiate receptors" *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18 (1978) 371-394
- Simon, E.J., Hiller, J.M., und Edelman, I. "Stereospecific binding of the potent Narcotic Analgesic ³H-Etorphine to Rat Brain Homogenate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 1947-1949
- Simon, J., Szűcs, M., Benyhe, A., Borsodi, A., Zeman, P., und Wolleman, M. "Solubilization and Characterization of Opioid Binding Sites from Frog (*Rana esculenta*) Brain" *J. Neurosci.* 43 (1984) 957-963
- Simon, P., Swillens, S., und Dumont, J.E. "Size determination of an equilibrium enzymatic system by radiation inactivation" *Biochem. J.* 205 (1982) 477-483
- Simonds, W.F., Burke, T.R.Jr., Rice, K.C., Jacobson, A.E., und Klee, W.A. "Purification of the opiate receptor of NG 108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4974-4979
- Simonds, W.F., Koski, G., Streaty, R.A., Hjelmeland, L.M., und Klee, W.A. "Solubilization of active opiate receptors" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4623-4627
- Snyder, S.H. "Opiate receptors in normal and drug altered brain function" *Nature* 257 (1975) 185-189
- Snyder, S.H. "Opiate receptors and internal opiates" *Scientific American* 326 (1977) 44-56

- Sommermeyer, K. "Die Entwicklung der Treffertheorie seit dem Jahre 1946 unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung auf die biologische Wirkung energiereicher Strahlen." In: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin, Krebsforschung (Ergebnisse 1952-1958) (Schinz, Holzhusen, Langendorff, Rajewsky und Schubert, Hrsg.) Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
- Squires, R.F., und Braestrup, C. "Benzodiazepine receptors in rat brain" *Nature* 266 (1977) 732-734
- Sterri, S.H., und Fonnum, F. "Isolation of Anions by Extraction with liquid Anion Exchangers and its Application to Micromethods for Acetylcholinesterase and 4-Aminobutyrate Aminotransferase" *Eur. J. Biochem.* 91 (1978) 215-222
- Streffer, C. "Strahlenbiochemie" Heidelberger Taschenbücher, Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1969)
- Su, T.-P. "Further demonstration of kappa opioid binding sites in the brain: Evidence for heterogeneity" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232 (1985) 144-148
- Sternweis, P.C., und Robinshaw, J.D. "Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotide from membrane of bovine brain" *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13806-13813
- Svedberg, T., und Broholt, S. "Splitting of protein molecules by UV light and alpha-rays" *Nature* 143 (1939) 938-939
- Swillens, S., und Dumont, J.E. "Pitfall in the Interpretation of Data on Adenylate Cyclase Inactivation by Irradiation" *FEBS Lett.* 134 (1981) 29-31
- Terenius, L. "Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of the cerebral cortex" *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenhagen)* 32 (1973) 317-320
- Timoféeff-Ressovsky, N.W., und Zimmer, K.G. "Biophysik I.: Das Trefferprinzip in der Biologie" Leipzig, Hirzel Verlag (1947)
- Traber, J., Fischer, S., Latzin, K., und Hamprecht, B., "Morphine antagonizes the action of prostaglandine in neuroblastoma and neuroblastoma x glioma hybrid cells" *Nature* 253 (1975) 120-122
- Verkman, A.S., Skorecki, K., Ausiello, D.A. "Radiation inactivation of oligomeric enzyme systems: Theoretical considerations" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 150-154

- Werling, L.L., Zarr, G.D., Brown, S.R., und Cox, B.M.
"Opioid Binding to Rat and Guinea-Pig Neural Membranes
in the Presence of Physiological Cations at 37°C" J.
Pharmacol. Exp. Ther. 233 (1985) 722-728
- Wregett, K.A., und De Léan, A. "The Ternary Complex Model.
Its properties and application to ligand interactions
with the D₂ dopamin receptor of the anterior pituitary
gland" Mol. Pharmacol. 26 (1984) 214-227
- Wright, C.R.A. "On the action of organic acids and their an-
hydrides on the natural alkaloids. Part I" J. Chem.
Soc. 27 (1874) 1031-1043
- Wüster, M., Schulz, R., und Herz, A. "The direction of opio-
id agonists towards mu-, delta- and epsilon-receptors
in the vas deferens of the mouse and the rat" Life Sci.
27 (1980) 163-170
- Wüster, M., Schulz, R., und Herz, A. "Multiple opiate recep-
tors in peripheral tissue preparations" Biochem. Phar-
macol. 39 (1981) 1883-1887
- Zukin, R.S., und Kream, R.M. "Chemical crosslinking of a so-
lubilized enkephalin macromolecular complex" Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 1593-1597
- Zukin, R.S., und Zukin, S.R. "The case for multiple opiate
receptors" Trends Neurosci. 7 (1984) 160-168

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie unter der Leitung von Prof. A. Herz ausgeführt, dem ich für seine freundliche Unterstützung herzlich danken möchte. An der Fakultät für Pharmazie der Universität München wurde die Arbeit freundlicherweise von Prof. H. Wagner betreut.

Besonders danken möchte ich auch Dr. M. Wüster, der diese Arbeit anregte und mir in der manchmal schwierigen Anfangsphase zur Seite stand. Für die langen, hilfreichen Diskussionen und die vielen Anregungen sei vor allem auch Dr. T. Costa gedankt.

Der Linearbeschleuniger wurde freundlicherweise von der physikalisch-technischen Abteilung der GSF, Neuherberg, bereitgestellt. Hier bin ich vor allem Dr. B. Hietel zu Dank verpflichtet, sowie D. Burkhardt für die Bedienung des Linearbeschleunigers und Dr. D. Regulla für die Dosimetrie mittels ESR-Spektroskopie.

Des weiteren danke ich A. Engel, Abteilung Neurophysiologie, und Dr. H. Nielson vom St. Hans Hospital (Roskjild, Dänemark) für Enzymbestimmungen zur Dosimetrie, sowie K. Rauh für die Erstellung eines Computerprogramms.

Zuletzt, aber nicht minder herzlich, bedanke ich mich bei Frau U. Bäuerle für ihre Hilfe bei der Zellkultur und die Anfertigung der Zeichnungen.

Lebenslauf

03. Februar 1958 : geboren in Homburg/Saar als Tochter von Dr.med. Bernhard Ott und seiner Frau Ruth, geborene Willems
- Ab Ostern 1964 : Besuch der Volksschule in Homburg/Saar
- Ostern 1968 : Übertritt in das staatliche Christian-von-Mannlich-Gymnasium in Homburg/Saar
- Mai 1977 : Abitur
- Sommer 1977 : Aufnahme des Pharmaziestudiums an der "Université d'Angers", Frankreich
- Januar 1978 : Wechsel an die pharmazeutische Fakultät der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg/Breisgau
- August 1979 : 1. Pharmazeutische Prüfung
- Sommer 1980 : dreimonatiges Auslandspraktikum in der Apotheke von Mr. Brien, London
- März 1981 : 2. Pharmazeutische Prüfung
- Mai 1981 -
April 1982 : Praktisches Jahr bei Dr. A. Lesmüller in der Engel Apotheke, München
- Mai 1982 : 3. Pharmazeutische Prüfung und Approbation zur Apothekerin
- Juli 1982 - 1985 : Ausführung der vorliegenden Promotionsarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Albert Herz in der Abteilung für Neuropharmakologie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München
- Ab August 1985 : Stipendiatin an diesem Institut

